

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. Februar 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/16378 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07H 1/00**,  
15/26

[DE/DE]; Wilhelm-Mayer-Strasse 2, 67227 Frankenthal  
(DE). **KLIEM, Hans-Christian** [DE/DE]; Daimlerstrasse  
14K, 64646 Heppenheim (DE). **SAUERBREI, Bernd**  
[DE/DE]; Friedensalle 251, 22763 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03237

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. August 2001 (22.08.2001)

(74) Anwalt: **SCHÜSSLER, Andrea**; Huber & Schüssler,  
Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:  
100 41 221.1 22. August 2000 (22.08.2000) DE

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-  
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS**  
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg  
(DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WEISSLER, Manfred**

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING WATER-SOLUBLE SACCHARIDE CONJUGATES AND SACCHARIDE MIMETICS  
BY DIELS-ALDER REACTION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON WASSERLÖSLICHEN SACCHARIDKONJUGATEN UND  
SACCHARIDMIMETIKA DURCH DIELS-ALDER-REAKTION

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing saccharide compounds in a very simple manner. The inventive method comprises the following steps: (a) attaching at least one saccharide to a cyclic or acyclic diene, (b) reacting the saccharide-containing diene obtained in step (a) or a commercially available saccharide-containing diene with a dienophile by Diels-Alder reaction.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren mit dem Saccharid-Verbindungen auf sehr einfache Weise hergestellt werden können. Dieses Verfahren umfaßt die Schritte: (a) Anknüpfung mindestens eines Saccharids an ein cyclisches oder acyclisches Dien, (b) Umsetzung des in Schritten (a) entstandenen Saccharid-enthaltenden Diens oder eines käuflich erhältlichen Saccharid-enthaltenden Diens mit einem Dienophil mittels Diels-Alder-Reaktion.



**WO 02/16378 A1**

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON WASSERLÖSLICHEN SACCHARIDKONJUGATEN UND  
SACCHARIDMIMETIKA DURCH DIELS-ALDER-REAKTION

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Substanzbibliotheken auf der Grundlage von natürlich vorkommenden Sacchariden und Saccharidmimetika.

Es ist bekannt, daß die Interaktionen zwischen Proteinen und natürlichen oder synthetischen Oligosacchariden hochspezifisch sind. An diesen Interaktionen sind im wesentlichen Wasserstoffbrückenbindungen, wechselseitig vorhandene Donoren und Acceptoren sowie hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt. Die dabei erreichten Bindungskonstanten sind allerdings um mehrere Größenordnungen geringer als diejenigen, die bei Antigen-Antikörper Interaktionen gemessen werden. Um auf der Basis von Sacchariden eine Optimierung der genannten Wechselwirkungen durchführen zu können und alle Arten von Wechselwirkungen zuzulassen, müssen eine große Anzahl substituierter Saccharide und Saccharidmimetika ausprobiert werden und synthetisiert werden. Die Grundidee dabei ist die Entwicklung von wirkungsvollen Therapeutika auf Saccharidbasis. Ein großes Problem bei der Synthese von Saccharid(e)-enthaltenden Verbindungen ist allerdings die komplizierte mehrstufige Verfahrensdurchführung, die zusätzlich noch eine ausgeprägte Schutzgruppenchemie verlangt. Dies gilt insbesondere, wenn mehrere Saccharide in bzw. an eine Verbindung synthetisiert werden sollen oder Saccharid-Bibliotheken aufgebaut werden sollen. Es besteht deshalb der dringende Bedarf nach einem

Verfahren mit dem auf einfache Weise auch kompliziert aufgebaute Saccharid(e)-enthaltende Verbindungen synthetisiert werden können. Speziell ist daran gedacht mit dem Verfahren Saccharid-Cluster aufbauen zu können, die sich als Therapeutika eignen, weil sie mit Rezeptoren in bzw. auf Zellen oder Organen wechselwirken. Desweiteren sollen damit Saccharid-Bibliotheken und Saccharid-enthaltende Verbindungsbibliotheken aufgebaut werden. Ferner soll sich das Verfahren eignen, um Saccharide mit Peptiden, Nucleinsäuren und/oder Lipiden zu verknüpfen, wobei auch eine Verknüpfung der Polymere untereinander möglich sein soll.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem auch kompliziert aufgebaute Saccharid-Verbindungen oder Bibliotheken, wie vorstehend erwähnt, aufgebaut werden können.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

Von den Erfindern wurde ein Verfahren zur Synthese von Saccharid-Verbindungen entwickelt, das die folgenden Schritte aufweist:

- (a) Anknüpfung mindestens eines Saccharids an ein cyclisches oder acylisches Dien,
- (b) Umsetzung des in Schritt (a) entstandenen Saccharid-enthaltenden Diens oder eines käuflich erhältlichen saccharidhaltigen Diens mit einem Dienophil mittels Diels-Alder-Reaktion.

Die Diels-Alder-Reaktion ist eine Reaktion, bei der ein Dien mit einem Olefin reagiert, wobei ein Übergangszustand durchlaufen wird, an dem 6 $\pi$ -Elektronen beteiligt sind. Dieser Übergangszustand verleiht den Diels-Alder-Reaktionen, im

Vergleich zu den üblichen organischen Reaktionen, relativ niedrige Aktivierungsenergien, so daß diese Reaktionen bereits bei Raumtemperatur oder leicht erhöhten Temperaturen ablaufen können. Diels-Alder-Reaktionen können durch hohen Druck beschleunigt werden. Gerade in den letzten Jahren sind eine Reihe von Katalysatoren bekannt geworden, die in der Lage sind, unter milden Bedingungen effektiv Diels-Alder Reaktionen zu katalysieren (K. Pindur et al., Chem Rev. 1993, 93, S. 741-761; Kündig et al., Angew. Chem. 1999, 111, S. 1298-1301). Da Diels-Alder Reaktionen grundsätzlich reversibel sind, eignet sich dieser Reaktionstyp auch für die dynamische kombinatorische Chemie. Die Bildung von exo- und endo-Isomeren kann über die Temperatur und auch den Katalysator gesteuert werden. Hinsichtlich der Ausbeuten bietet die Diels-Alder Reaktion große Vorteile, da sie ohne weitere Nebenprodukte und mit nahezu quantitativer Ausbeute verläuft. Die Diels-Alder Reaktion wird daher von den Erfindern eingesetzt, um kompliziert aufgebaute Saccharid-Verbindungen und Bibliotheken aus Saccharid-enthaltenden Verbindungen bzw. Saccharid-Bibliotheken aufzubauen. Bei geschickter Substitution der beiden Ausgangsverbindungen (Dien und Dienophil) mit funktionellen Gruppen oder Resten sind damit Moleküle zugänglich, die drei oder sogar vier unterschiedliche Reste enthalten können.

Erfindungsgemäß eignen sich als cyclische Dien-Komponente in Schritt (a) vorzugsweise Furan, Fulven, Furfural, Cyclopentadien, Cyclohexadien, Pyrrol, 1,3-Oxazol, 1,2-Oxazol, Pyrazol, Thiophen und als acyclische Verbindungen 1,3-Diene (z.B. trans-trans Hexadien-2,4-1,6-diol), welche mit funktionellen Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können. Die funktionellen Gruppen können ausgewählt sein aus beispielsweise Alkylketten ( $C_2 - C_{20}$ , bevorzugt Methyl, Ethyl, iso-Propyl, Tert.-Butyl usw.), OH, SH, Halogene, Aryl-

, Carboxyl-, Carbonyl-, Nitro-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure- oder Amino-Gruppen, die direkt oder über Alkylreste gebunden sind. Die Dien-Komponente kann aber auch Aminosäure-, Peptid-Substituenten, Lipid-Substituenten oder Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäure-Substituenten tragen. An die Dien-Komponente lassen sich auch alle Arten pharmazeutischer Wirkstoffe, Markierungen, Farbstoffe oder Komplexe (z.B. Carboran, Ferrocen) koppeln.

Bevorzugte Dien-Komponenten sind: Bishydroxyalkylfurane, wie 2,3-Bishydroxymethylfuran, 3,4-Bishydroxymethylfuran, 2,5-Bishydroxymethylfuran, Hydroxymethylfurfural,  $\alpha$ -GMF ( $\alpha$ -Glycosylmethyl-furfural; bzw. mit z.B.  $\text{NaBH}_4$  reduzierter Aldehydfunktion). Ebenso können natürlich auch deren Homologe mit Ethyl- oder Propylgruppe statt Methyl- eingesetzt werden. Die Dien-Komponenten sind käuflich erhältlich z.B. Fa. Aldrich (Furfural = Aldrich #27,886-6; Hydroxymethylfurfural = Aldrich #4,080-7; 3-Hydroxymethyl-furan = Aldrich #19,639-8) oder Fa. Südzucker AG ( $\alpha$ -GMF). Allgemein gilt, daß 2,5-disubstituierte Furane in Diels-Alder-Reaktionen eine geringere Reaktivität besitzen als 3,4-disubstituierte. Diese abgestufte Reaktivität läßt sich synthetisch nutzen. Dabei ist von Vorteil, daß sich die Reaktivität von Hydroxymethylgruppen in den einzelnen Positionen des Furans unterscheidet, so daß eine sequentielle Substitution möglich wird. Damit lassen sich sehr einfach verschiedene Saccharide in das Furan einführen (s. Fig. 1). Cyclopentadien und seine substituierten Abkömmlinge eignen sich ebenfalls sehr gut als Diene bei der Diels-Alder-Reaktion. Aldehyd-Derivate des Cyclopentadiens sind schon lange bekannt (Chem. Ber. 1964, 97, S. 2066) und können schrittweise in die Hydroxymethylverbindungen überführt werden, die nach der Imidat-Methode mit Sacchariden umgesetzt werden und dann als

Diene verfügbar sind. Carbonsäure-Derivate des Cyclopentadiens sind ebenfalls bekannt, wie Ester, Amide oder Nitrile (J. Chem. Soc. 1966, S. 1641). Dabei sind Cyclopentadien-tetra-carbonsäureester auch aus den entsprechenden Cyclopentan-Vorstufen durch Dehydrierung darstellbar. Diese Vorstufen wiederum sind leicht aus den Diels-Alder-Addukten aus Cyclopentadien und Maleinsäureanhydrid zugänglich. Auch durch Cyclisierungsreaktionen von 1,3-Diacarbonyl-Verbindungen können Cyclopentadiene hergestellt werden (J. Chem. Soc. 1952, S. 1127). In der Natur vorkommende Iridoid-Glucoside wie Catapol und Aucubin (Liebigs Ann. Chem. 1990, S. 715) können als Vorstufen für ssacharid-substituierte Cyclopentadiene betrachtet werden (THL 1997, 38, S. 6433). Daneben können die genannten Glucoside auch als Dienophile bei der Generierung von Substanz-Bibliotheken zur Wirkstoffsuche verwendet werden.

Im Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Saccharid mit einem Dien verknüpft, indem das Dien mit einer Imidat-Komponente umgesetzt wird, die mit einem Saccharid substituiert ist. Die Reaktionsbedingungen für diese Reaktion sind beispielsweise von R.R. Schmidt, in: Glycosciences, ed. H.J. Gabius, S. Gabius, S. 31-53 beschrieben worden. Die Verknüpfung des Saccharids mit der Dien-Komponente kann auch mittels anderer Reaktionen (z.B. mittels der bekannten Königs-Knorr-Reaktion) erfolgen. Der Begriff "Saccharid" umfaßt Saccharide jeglicher Art, insbesondere Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharide (z.B. mono-, di- tri-, multi-antennäre sowie dendritische Saccharide) in allen stereoisomeren und enantiomeren Formen. Diese können Pentosen oder Hexosen sein, welche in der L- oder D-Form vorliegen. Als Monosaccharide sind insbesondere Glucose, ganz besonders  $\alpha$ - und  $\beta$ - D-Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Arabinose,

Xylose, Fucose, Rhamnose, Digitoxose und Derivate davon bevorzugt. Als Disaccharide eignen sich insbesondere Saccharose, Maltose, Laktose oder Gentobiose, entweder 1,4- oder 1,6-verknüpft, sowie Derivate davon. Als Saccharide gelten hier auch Zuckeralkohole, Polyole, Inositol und Derivate davon, ganz besonders cis-Inositol, epi-Inositol, allo-Inositol, myo-Inositol, muco-Inositol, chiro-Inositol, neo-Inositol, scyllo-Inositol, Pinpollitol, Streptamin, Quercitol, Chinasäure, Shikimisäure, Conduritol A bzw. B, Validatol und Quebrachitol, z.B. aus Galactinolen, sowohl aus pflanzlichen Quellen, wie Zuckerrüben (daraus erhältlich: Hydroxymethylfurfural; F.W. Lichtenthaler, Mod. Synth. Meth. 1993, 6, S. 273-376), als auch aus Milchprodukten, oder durch enzymatische Enantiomerentrennung gewonnene Verbindungen. Ferner sind erfindungsgemäß einsetzbare Saccharide Glycokonjugate. Diese können Konjugate von z.B. Sacchariden mit Peptiden, Lipiden, Säuren (--> Ester), Alkylresten (---> Ether), Heterozyklen oder anderen Kohlenhydraten sein. Ein Beispiel von Glycokonjugaten ist Z1-Z10, ein Gemisch von 10 Glycokonjugaten. Bei den Verbindungen Z1-Z10 handelt es sich um in der Natur vorkommende Glycopeptide, Glycoproteine und Lipopolysaccharide. Derivate der erwähnten Saccharide sind z.B. mit Schutzgruppen (z.B. Benzoyl-, Silyl-, Dimethoxytrityl-) geschützte Saccharide und/oder mit funktionellen Gruppen, wie Amino-, Nitro-, Carboxy-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure-, Phosphonsäure-, Mono/Di/Trilalkylamidgruppen oder Halogenidgruppen, modifizierte Saccharide. Vorstehende Saccharide können natürlich vorkommen oder synthetisch hergestellt sein. Vorzugsweise weist das Imidat nur ein Saccharid auf, aber auch eine Anzahl von 2, 3, 4, 5 und 6 Saccharid-Komponenten ist denkbar, wenn das Imidat entsprechend ausgewählt ist. Die Saccharide können dabei gleich oder verschieden voneinander sein.

Bevorzugte Saccharid-substituierte Imidat-Komponenten sind Tri-O-Benzoyl-fucoseimidat oder Tetra-O-Benzoyl-galactoseimidat. Die Saccharid-substituierten Imidat-Komponenten werden beispielsweise gemäß H. Paulsen et al., 1992, Liebigs Ann. Chem. 747-750 hergestellt.

Um in Schritt (a) ein vollständig mit Sacchariden modifiziertes Dien zu erhalten, kann die vorbeschriebene Reaktion des Diens mit dem Saccharid-substituierten Imidat mehrfach hintereinander stattfinden (s. Beispiel 1) oder das Imidat wird im Überschuß zugesetzt, wobei dann nach der Reaktion ein- und mehrfach Saccharid-modifiziertes Dien voneinander getrennt werden sollten, um im nachfolgenden Schritt (b) zu einheitlichen Produkten zu kommen. Die in Schritt (a) aus den vorstehend als bevorzugt genannten Dienen und Saccharid-substituierten Imidaten herstellbaren Verbindungen sind beispielsweise 3,4-Bis-(fucosyl-oxymethyl)-furan, 3,4-Bis-(galactosyl-oxymethyl)-furan, 3-Fucosyloxymethyl-4-galactosyloxymethylfuran, 2,5-Bis-galactosyloxymethyl-furan, 2,5-Bis-fucosyloxymethyl-furan, 2-Fucosyloxymethyl-5-galactosyloxymethylfuran und Alkohole, abgeleitet von Furan-2,5-di- $\beta$ -propionsäure oder abgeleitet von Furan-2,5-di-essigsäure. Falls die Verbindungen Schutzgruppen enthalten (vorzugsweise: Benzoylschutzgruppe) können diese z.B. mit Natriummethanolatlösung gemäß Standardverfahren abgespalten werden.

In Schritt (b) eignen sich als Dienophile Maleinsäure(anhydrid)-Derivate, Fumarsäure(anhydrid)-Derivate, Maleinimid-Derivate (bevorzugt: N-substituiertes Maleinimid), Acrylsäure-Derivate, Acetylen-Derivate, Butindicarbonsäure bzw. dessen Derivate oder Enolether. Unter Derivaten sind dabei jene, die nach Substitution des



genannten Verbindungen Alkylketten ( $C_2 - C_{20}$ ),  $-OH$ ,  $SH$ , Halogenen, Aryl-, Carboxy-, Carbonyl-, Nitro-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure-, Amino-, Phosphonsäure- oder Mono/Di/Trialkylamid-Gruppen tragen. Desweiteren kann die Dienophil-Komponente mit Sacchariden gemäß der vorstehenden Definition substituiert sein. Die Dienophil-Komponente kann aber auch Aminosäure-, Peptid-Substituenten, Lipid-Substituenten oder Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäure-Substituenten tragen. An die Dienophil-Komponente lassen sich auch alle Arten pharmazeutischer Wirkstoffe, Markierungen, Farbstoffe oder Komplexe koppeln. Bevorzugte Dienophile sind Tris-(2-Maleinimidoethyl)amin (TMEA), N-Phenyl, N-Ethyl, Maleinimidolysin oder Conduritol.

Die Dien- als auch die Dienophil-Komponente können einzeln oder beide auch aromatische oder heterozyklische Reste enthalten. Diese können ausgewählt sein aus: Phenyl-, Thienyl-, Thiophenyl-, Furyl-, Furanyl-, Pyranyl-, Pyrrolyl-, Imidazolyl-, Pyrazolyl-, Pyridyl-, Pyrazinyl-, Pyrimidinyl-, Pyrazinyl-, Pyridazinyl-, Thiazolyl-, Oxazolyl-, Indolyl-, Furazanyl-, Pyrrolinyl-, Imidazolinyl-, Pyrazolinyl-, Thiazolinyl-, Triazolyl-, Tetrazolyl-Gruppe, sowie die Positionsisomeren des oder der Heteroatome, die diese Gruppen umfassen können, ein Rest bestehend aus carbocyclischen kondensierten Ringen, beispielsweise die Naphthylgruppe oder die Phenanthrenylgruppe, ein Rest bestehend aus kondensierten heterocyclischen Ringen, beispielsweise Benzofuranyl, Benzothienyl, Benzimidazolyl, Benzothiazolyl, Naphtho[2,3-b]thienyl, Thianthrenyl, Isobenzofuranyl, Chromenyl, Xanthenyl, Phenoxathionyl, Indolizinyl, Isoindolyl, 3H-Indolyl, Indolyl, Indazolyl, Purinyl, Chinolizinyl, Isochinolyl, Chinolyl, Phthalzinyll, Naphthyridinyl, Chinoxalinyll, Chinazolinyl, Chinolinyl, Pteridinyl,

Carbazolyl,  $\beta$ -Carbolinyl, Cinnolinyl, Acridinyl, Phenazinyl, Phenothiazinyl, Phenoxazinyl, Indolinyl, Isoindolinyl, Imidazopyridyl, Imidazopyridimidinyl oder auch die kondensierten polycyclischen Systeme bestehend aus heterocyclischen Monozyklen, wie beispielsweise vorstehend definiert, wie beispielsweise Thionaphthenyl, Furo[2,3-b]pyrrol oder Thieno[2,3-b]furan, und insbesondere die Phenyl-, Furylgruppen, wie 2-Furyl, Imidazolyl, wie 2-Imidazolyl, Pyridyl, wie 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, Pyrimidinyl, wie Pyridimid-2-yl, Thiazolyl, wie Thiazol-2-yl, Thiazolinyl, wie Thiazolin-2-yl, Triazolyl, wie Triazolyl-2-yl, Tetrazolyl, wie Tetrazol-2-yl, Benzimidazolyl, wie Benzimidazol-2-yl, Benzothiazolyl, Benzothiazol-2-yl, Purinyl, wie Purin-7-yl, oder Chinolyl, wie 4-Chinolyl.

Die Diels-Alder-Reaktion ist ein Standardverfahren der organischen Chemie und die Reaktionsbedingungen sind einem Fachmann wohl bekannt bzw. können in einschlägigen Lehrbüchern nachgeschaut werden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird die Diels-Alder-Reaktion vorzugsweise in beliebigen Lösungsmitteln zwischen 20°C und 100°C durchgeführt. Bevorzugte Lösungsmittel sind Wasser oder Alkohole, wie Methanol oder Ethanol. Die Bildung von exo- und endo-Verbindungen, wie sie bei diesem Typ von Diels-Alder-Reaktionen beobachtet werden, kann durch die experimentellen Bedingungen gesteuert werden und vergrößert die Zahl der zu erhaltenden Verbindungen um den Faktor zwei. Diese Variation der experimentellen Bedingungen liegt im Können eines Durchschnittsfachmanns.

Alle Diels-Alder-Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen, bei denen in Abhängigkeit von der Temperatur auch immer auch die Komponenten zugegen sind und somit anderweitig aus dem Gleichgewicht heraus mit anderen Partnern abreagieren können.

Damit eignet sich das vorstehend beschriebene System auch zur kontrollierten Freisetzung der Dienophil-Komponente, bei gleichzeitiger Verankerung der Dien-Komponente an einem Polymerträger oder umgekehrt. Trägt das Dienophil z.B. ein Peptid oder ein Therapeutikum so steht damit ein System zur Verfügung, das für die kontrollierte und steuerbare Freisetzung von Arzneimitteln von einer Festphase genutzt werden kann. In Erweiterung vorstehend beschriebener Reaktionen steht mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Möglichkeit der Verknüpfung von Peptiden mit Sacchariden, von Peptiden mit Nukleinsäuren, von Sacchariden mit Nukleinsäuren und der jeweiligen Komponente mit sich selbst zur Verfügung, sofern die eine Komponente mit einem Dien und die andere mit einem Dienophil verbunden wäre. Die entstandenen Diels-Alder Addukte können selbst noch abgewandelt werden, z.B. durch Ringöffnung des Anhydridringes oder auch durch Hydrierung der Doppelbindung oder durch Additionsreaktionen an diese Doppelbindung.

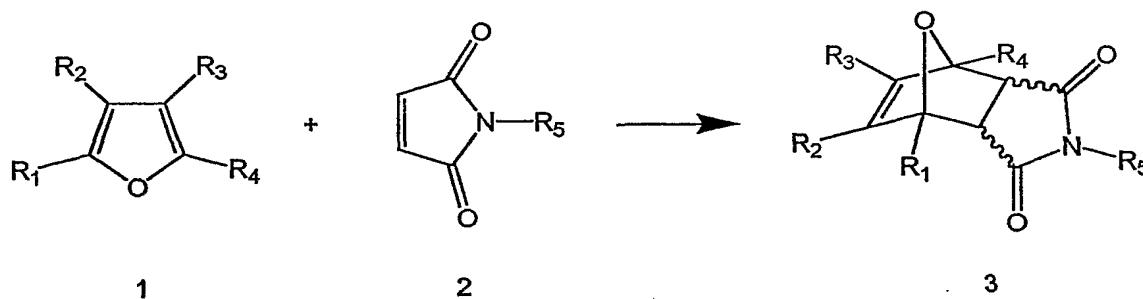
Das Oxa-bicycloheptan-Ringsystem kann unter sauren Bedingungen zu einem Cyclohexan-Ringsystem geöffnet werden. Dabei ist eine Spaltung des Diels-Alder Addukts in die Komponenten nicht mehr möglich und es entsteht ein neuer Strukturtyp, ein Inositolderivat, das sicher andere pharmakologische Eigenschaften aufweist, da es nicht mehr die Rigidität des Bicyclus besitzt.

Um größere Cluster oder Bibliotheken aufzubauen, müssen die Schritte a) und/oder b) des erfindungsgemäßen Verfahrens mehrmals hintereinander durchgeführt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann Schritt a) natürlich wegfallen, wenn von einem Saccharid-substituierter Dien bereits ausgegangen wird.

Nachfolgend sollen einige wichtige bevorzugte Aspekte der vorliegenden Erfindung hervorgehoben werden, wobei diese nicht als Beschränkung des breiten Verfahrenskonzepts auszulegen sind.

In der Diels-Alder-Reaktion (Schema 1) wird ein Dien 1 mit einem Dienophil 2 zur Reaktion gebracht.



Schema 1

Das Dien 1 (hier: Furan mit den Substituenten R<sub>1</sub> bis R<sub>4</sub>) wird dabei in wässriger Lösung direkt mit dem Dienophil 2 (hier: Maleinimid mit dem Substituenten R<sub>5</sub>) zur Reaktion gebracht. Dabei entsteht ein Produktgemisch aus endo- und exo-Diels-Alder-Produkt 3. Die Zusammensetzung des Produktgemisches kann gesteuert werden. Zudem ist es möglich, endo- und exo-Verbindung chromatographisch voneinander zu trennen.

(Bedeutung von R<sub>1</sub> bis R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub>: Es können ein oder mehrere Substituenten und in allen denkbaren Kombinationen eingebaut werden. Zur Definition der Reste: siehe vorstehend)

Im folgenden werden daher zunächst einige Darstellungsmöglichkeiten von Dienen (vom Typ 1, Schema 1) und deren Saccharidkonjugation, dann der Dienophile (vom Typ 2) und schließlich die Diels-Alder Reaktion beschrieben.

**Darstellung der Diene (bevorzugt Furanderivate):**

Dem erfindungsgemäßen Konzept entsprechend werden saccharidmodifizierte Furanderivate hergestellt. Geeignete Verbindungen sind daher Furanderivate, die eine Hydroxygruppe enthalten (direkt oder durch Spacer vom Ring entfernt), welche die kovalente, glycosidische Verknüpfung mit einem Saccharidmolekül erlaubt (z.B.  $R_1 = CH_2-OH$ ). Die Synthesemöglichkeiten hierfür sind zahlreich und zumeist literaturbekannt.

Stellvertretend für die leichte Zugänglichkeit der benötigten Furanderivate und die Leistungsfähigkeit der Synthesewege sind die folgenden Reaktionsschemata (Fig. 5(a) - (f)) angeführt.

Neben den hier vorgestellten Synthesewegen gibt es noch andere, bereits literaturbekannte Varianten. Die hier beschriebenen Diene sind beispielhaft aufgeführt. Daneben gibt es noch eine weitere Zahl von Dienen, die nach Konjugation mit Sacchariden von den Erfindern in Diels-Alder Reaktionen eingesetzt wurden. Diese sind weiter unten tabellarisch dargestellt.

#### **Synthese der saccharidhaltigen Diene**

Die kovalente Verknüpfung der Furanderivate mit Sacchariden erfolgt bevorzugt nach der Imidatmethode (Schema 3, s. Fig. 6). Im ersten Schritt der Reaktion (A) wird die einfache Galactosidierung erreicht, indem jeweils ein Äquivalent Furanderivat mit einem Äquivalent Galactoseimidat zur Reaktion gebracht wird. Die Mono-galactosidierte Verbindung wird chromatographisch aufgereinigt. In einem zweiten Schritt der Umsetzung (B) wird dann 1 Äquivalent eines weiteren Glycosylimidates zugesetzt. Bei zweifacher Umsetzung mit Gal-Imidat wird so nach Abspaltung der Schutzgruppen eine Verbindung mit zwei Galactoseeinheiten erhalten. Setzt man

dagegen in Schritt B das Fucose-imidat ein, so wird ein gemischt glycosidiertes Furanderivat nach Abspaltung der Schutzgruppen erhalten. Die gesamte Reaktion kann aber auch durch Königs-Knorr-Reaktion oder andere in der Literatur bekannte Methoden erfolgen.

#### Kombinatorik mit Furansacchariden

Umsetzung von 2,3,4-Trishydroxyfuran (oder anderen „polyhydroxylierten“ Furanderivaten) mit der dreifachen molaren Menge des Mixes an 10 verschiedenen Imidaten in gleichen Verhältnissen. Abspaltung der Schutzgruppen und Diels-Alder Reaktion mit einem markierten Maleinimid im Überschuß. Isolierung der markierten Bibliothek und Test auf fixierte Zellen. Durch Variation der Saccharidimide, Hinzufügen und Weglassen und ihrer Konzentrationen lassen sich die optimal wirksamen Strukturen ermitteln.

Wird als Dien ein zweifach mit Zuckerresten substituiertes Furan und als Dienophil ein N-substituiertes Maleinimid eingesetzt, das über einen Spacer beliebiger Länge ein Saccharid trägt, so entstehen bei der Diels-Alder-Reaktion Trisaccharide. Nach diesem Schema läßt sich bei der Verwendung von z.B. zehn unterschiedlichen Saccharidimidaten eine Bibliothek mit fast 1000 verschiedenen Trisacchariden generieren. Da die Schutzgruppen sowohl des Diens als auch des Dienophils vorher abgespalten werden können, kann die Diels-Alder-Reaktion in Wasser durchgeführt werden, was sich günstig auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute auswirkt (s. Fig. 2).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich Substanzen/Bibliotheken herstellen, die sich eignen, die Interaktion von Lektinen mit Proteinen zu inhibieren. Solche

Substanzen können bei der Krebstherapie zur Vermeidung der Metastatisierung oder als Entzündungshemmer Verwendung finden. Bei Verwendung von Spacern, wobei diese sowohl im Dien als auch im Dienophil eingefügt werden können, oder von seltenen oder mit ungewöhnlichen funktionellen Gruppen versehenen Sacchariden, erhöht sich die Diversität der Bibliotheken. Die Multiantennarität, die für die Interaktion von Sacchariden mit Lektinen von Bedeutung sein kann, läßt sich ebenfalls mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens herstellen. Durch die zwei- oder dreifache Diels-Alder-Reaktion mit einem entsprechenden Dienophil sind solche Moleküle leicht zugänglich (s. Fig. 3).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sind auch Verbindungen/Bibliotheken generierbar, die neben den Sacchariden auch andere pharmakophore Gruppen enthalten, um allgemein neue Leitstrukturen für Therapeutika zugänglich zu machen. Solche Gruppen können Heterozyklen, Aromaten oder auch peptidische Strukturen sein, die entweder im Dien oder Dienophil enthalten sind. Durch diese vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten erhöht sich die Diversität der Bibliotheken beträchtlich. Günstig kann in diesem Zusammenhang auch die oft geringe konformative Beweglichkeit der entstehenden Diels-Alder-Produkte sein, da sich solche Strukturen besser an Rezeptoren anlagern. Durch das Vorhandensein der Saccharidreste in den Produkten sind diese entsprechend wasserlöslich.

Die Diels-Alder-Reaktion von Dienen mit Dienophilen (z.B. substituierten Maleinimiden) kann auch zur Verbindung von Proteinen mit Sacchariden und von Sacchariden mit Nukleinsäuren eingesetzt werden. Hier ist es zweckmäßig, einen Lysinrest im Protein zu haben, der über die freie Aminogruppe die Anfügung des Maleinimid-Restes gestattet. Es

ist aber auch denkbar, daß am aminoterminalen Ende ein Lysin-Rest angefügt wird. Bei diesen so zugänglichen Neoglycoproteinen läßt sich der Einfluß von unterschiedlichen (Oligo)Sacchariden auf die Wirksamkeit der Proteine oder deren Pharmakokinetik untersuchen. Auf dem gleichen Weg ist auch eine Markierung von Sacchariden mit Biotin problemlos durchführbar, was für eine mögliche Diagnostik auf der Basis von Lektin-Saccharid-Wechselwirkungen von Wichtigkeit wäre (Fig. 2).

Die Diels-Alder-Reaktion von Dienen (z.B. substituierten Furanen) mit Dienophilen (z.B. substituierten Maleinimiden) führt auch zur Dotierung von Oberflächen mit Sacchariden, Lipiden, Peptiden oder (Oligo)nukleotiden. Dabei kann sowohl das Dienophil als auch das Dien auf der Oberfläche immobilisiert sein. Eine Anwendung in der Chip-Technologie ist somit denkbar. Auch die Erhöhung der Beladungsdichte auf der Oberfläche ist durch die Verwendung von Strukturen wie in Fig. 2 machbar.

Da die Diels-Alder-Reaktion mit diesen Komponenten sehr gut in Wasser durchzuführen ist und in der Regel keiner Katalyse bedarf, können alle Komponenten ohne Schutzgruppen miteinander umgesetzt werden. Dadurch entfällt die finale Abspaltung von Schutzgruppen, ein Prozeß der oftmals große Schwierigkeiten bereitet.

Da alle Diels-Alder-Reaktionen reversibel sind und sich die Gleichgewichte schon bei Raumtemperatur einstellen, kann die Umkehrung der Adduktbildung auch für die kontrollierte Freisetzung der Komponenten der Diels-Alder-Reaktion, die dafür mit Wirkstoffen beladen sind, eingesetzt werden.



Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, sind die natürlichen Bindungskonstanten zwischen Proteinen und (Oligo)sacchariden nicht sehr hoch. Offenbar bestand im Rahmen der Evolution kein Bedarf für eine weitere Optimierung dieser Bindungskonstanten. Aus grundsätzlichen Erwägungen heraus sollte es möglich sein, durch Zulassung aller Arten von Wechselwirkungen einschließlich ionischer Interaktionen, auf der Basis von Sacchariden und Saccharidmimetika wirkungsvolle Agonisten und Antagonisten von Rezeptoren in Analogie zu Peptiden darzustellen. Die Verwendung von substituierten Sacchariden, wobei alle Arten von funktionellen Gruppen eingesetzt werden können, auch solche, die bisher nicht in Sacchariden vorkommen, ist sicher eine Voraussetzung für diese Optimierung.

Mit Hilfe der kombinatorischen Chemie ist es möglich, sehr wirkungsvolle Agonisten und Antagonisten auf der Basis von Peptiden, Lipiden oder Nukleinsäuren zu identifizieren. Um daraus Therapeutika, vor allem für die orale Applikation, zu entwickeln, bedarf es aber Substanzen, die oral verfügbar sind. Eine notwendige Voraussetzung dafür ist die ausreichende Wasserlöslichkeit. Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und damit der oralen Verfügbarkeit, ist die kovalente Verknüpfung von Wirkstoffen mit Sacchariden unter Bildung von Konjugaten. Mit dem erfindungsgemäßen Ansatz ist es möglich, unter Anwendung eines kombinatorischen Ansatzes von vornherein das Problem einer ausreichenden Wasserlöslichkeit durch die Verwendung geeigneter Bausteine zu berücksichtigen. Dies bietet darüber hinaus noch den Vorteil, daß diese Bausteine auf der Basis von Sacchariden und ihrer Derivate Teil des Wirkstoffs werden und damit zur Stärkung der Bindung des Wirkstoffs an sein Target beitragen können. Von den Erfindern ist auch daran gedacht worden, das Verfahren auf die Festphase zu

übertragen, wobei sinnvollerweise die Bindung an die Festphase über den Saccharidteil erfolgt.

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Figuren beschrieben.

Fig. 1: Einführung von 2 Saccharidresten in ein Furansystem

Fig. 2: Reaktion eines zweifach substituierten Furans mit einem N-substituierten Maleinimid

Fig. 3: Mehrfache Diels-Alder-Reaktion

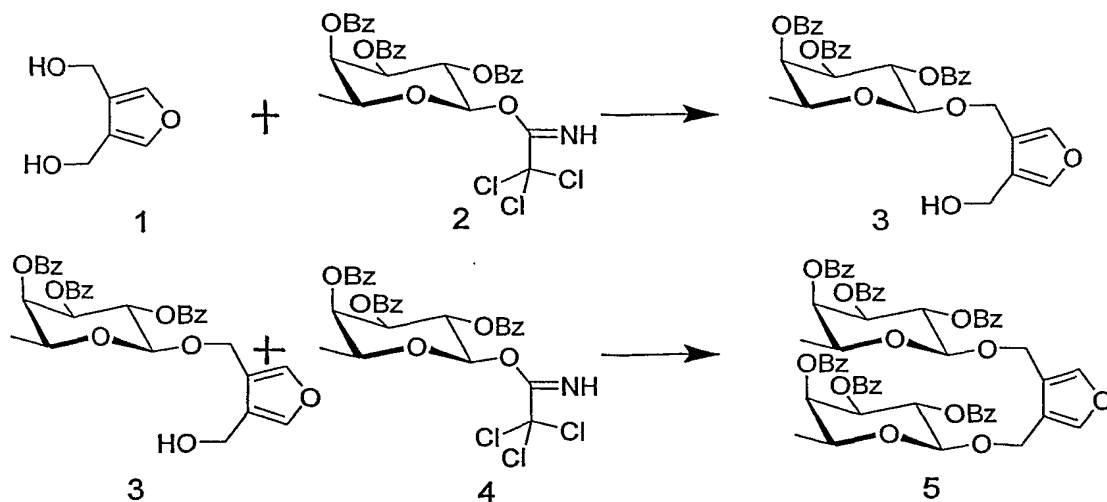
Fig. 4: Exemplarische Bausteine für die Diels-Alder Reaktion

Fig. 5(a) - (f): Darstellung von mit Sacchariden konjugierbaren Furanderivaten

Fig. 6: Glykosidierung von 2,5-Bis-hydroxymethylfuran

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele verdeutlicht.

Beispiel 1: Synthese von glycosidierten Hydroxymethylfuranen



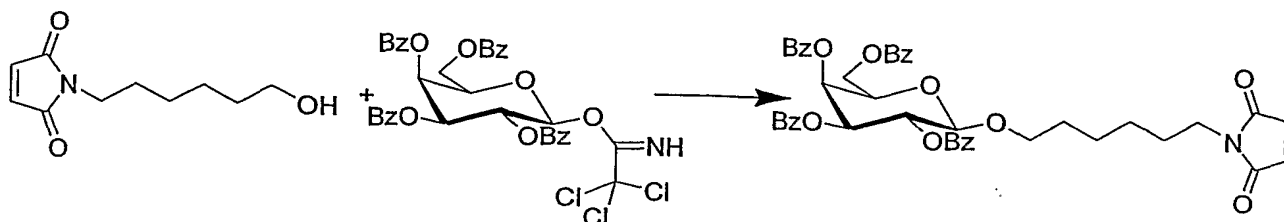
20 mmol 3,4-Bis-Hydroxymethylfuran **1** und 21 mmol Tri-O-Benzoyl-fucose-imidat **2** werden in 300 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf  $-40^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und mit einigen Tropfen Triflat versetzt. Die Reaktionslösung wird dann im Eisbad 1 Stunde gerührt, die organische Phase wird mit verdünnter Bicarbonatlösung und dann mit Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. eingeengt. Das Reaktionsprodukt **3** wird nach Säulenchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1) in einer Ausbeute von ca. 60% erhalten.

6 mmol Mono-fucosyliertes Furan **3** wird mit 6.3 mmol Imidat **4** wie oben beschrieben umgesetzt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1). Das Produkt **5** wird in einer Ausbeute von ca. 55% erhalten.

Zur Entschützung (Abspaltung der Benzoylgruppen) wurde das Produkt **5** mit Natriummethanolatlösung umgesetzt. Ausbeuten: ca. 60%.

Um die entsprechenden 2,5-Produkte herzustellen, wird im ersten Schritt statt 3,4-Bis-Hydroxymethylfuran das 2,5-Bis-Hydroxymethylfuran eingesetzt und analog wie vorstehend verfahren.

Beispiel 2: Glycosidierung von Maleinimid bzw. -Derivaten

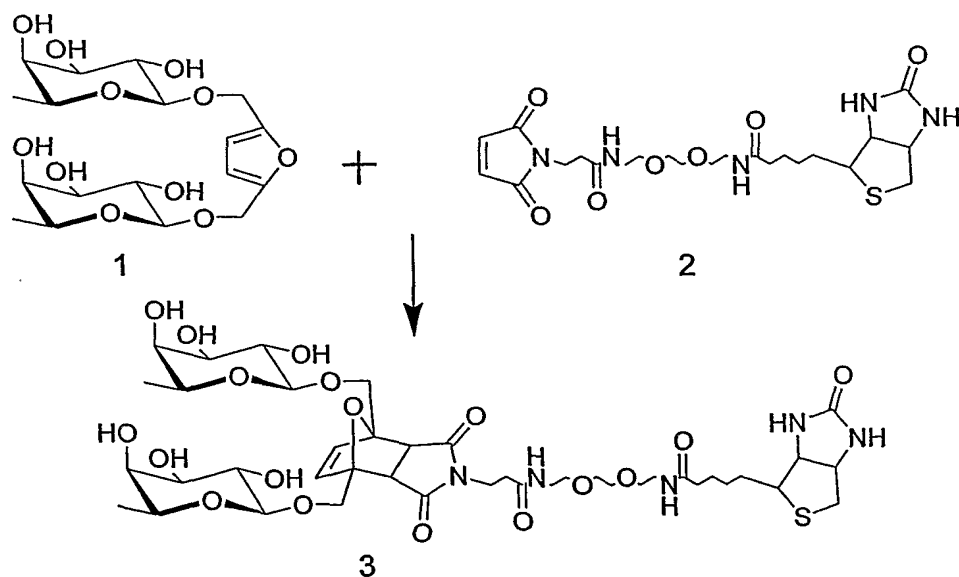
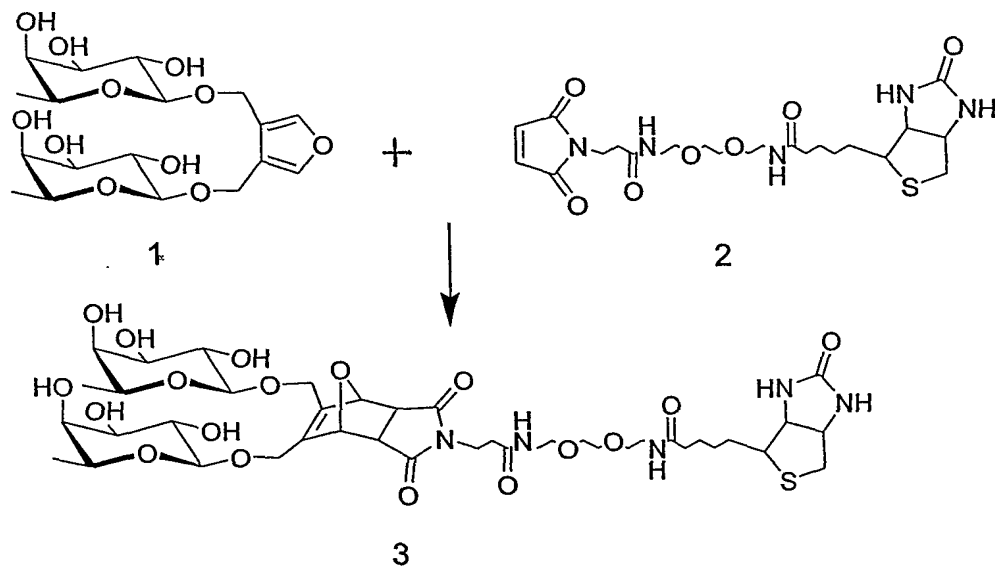


5 mmol geeignet derivatisiertes Maleinimid 1 (Maleinimid + Spacer + OH) werden mit 4.9 mmol Galactosylimidat 2 in 100 ml Dichlormethan gelöst und bei -40°C mit 10 Tropfen Triflat versetzt. Es wird bei 0°C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird die Reaktionslösung mit verdünnter Bicarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1) chromatographiert. Ausbeute an Produkt 3: 54%.

Zur Abspaltung der Benzoylgruppen wird mit Natriummethanolat oder einer Mischung aus Methanol/Wasser/Triethylamin umgesetzt.

Beispiel 3: Diels-Alder Reaktion

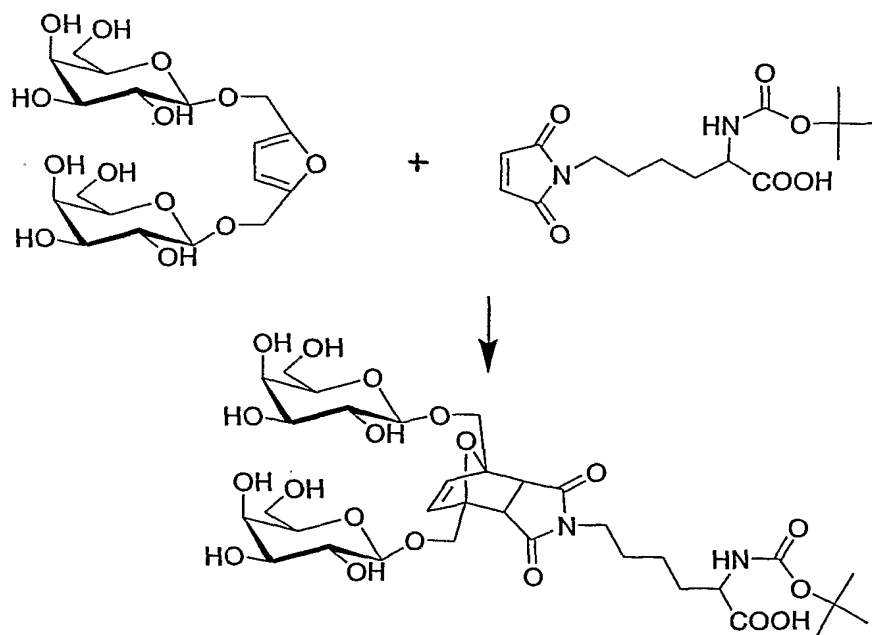
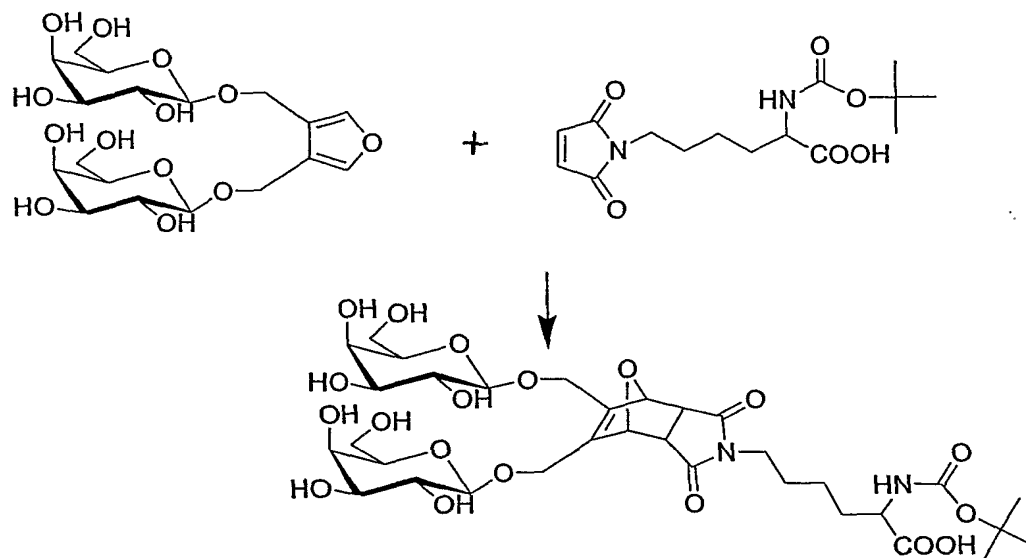
## a) Biotinylierung



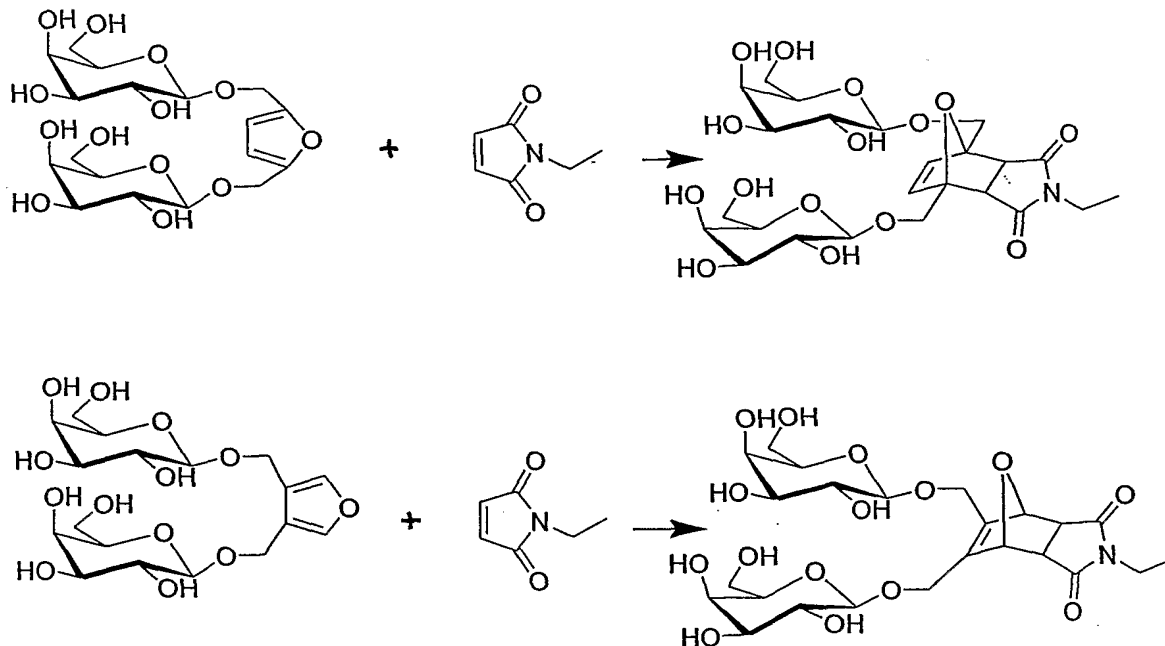
50  $\mu$ mol glycosidiertes Furan 1 (s. Beispiel 1) und 50  $\mu$ mol Biotinderivat 2 (Fa. Pierce, Kat.-No. 2 1900 ZZ) werden in 1 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird mittels HPLC kontrolliert. Nach beendeter Umsetzung wird die Reaktionslösung gefriergetrocknet. Das Produkt 3 (endo-/exo-Mischung) wird mittels präparativer HPLC isoliert. Ausbeute 50-60%.

- b) Unter den gleichen Bedingungen wurden auch folgende Reaktionen durchgeführt, wobei die Dien-Komponente jeweils gemäß Beispiel 1 hergestellt wurde und die Dienophil-Komponente gemäß K. Wakisaka et al., J. Med. Chem. 1997, 40, S. 2643-2652 hergestellt wurde.

Einführung eines Lysinrestes:

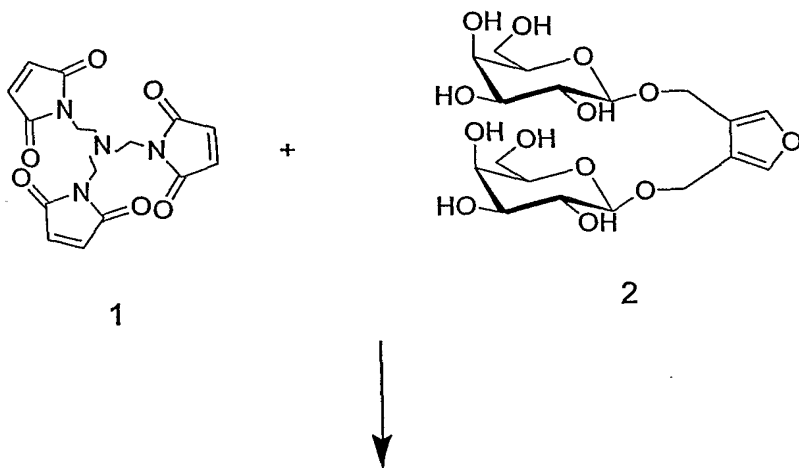


c) Umsetzung von 2,5 und 3,4-Glycosyl-hydroxymethylierten Furanen



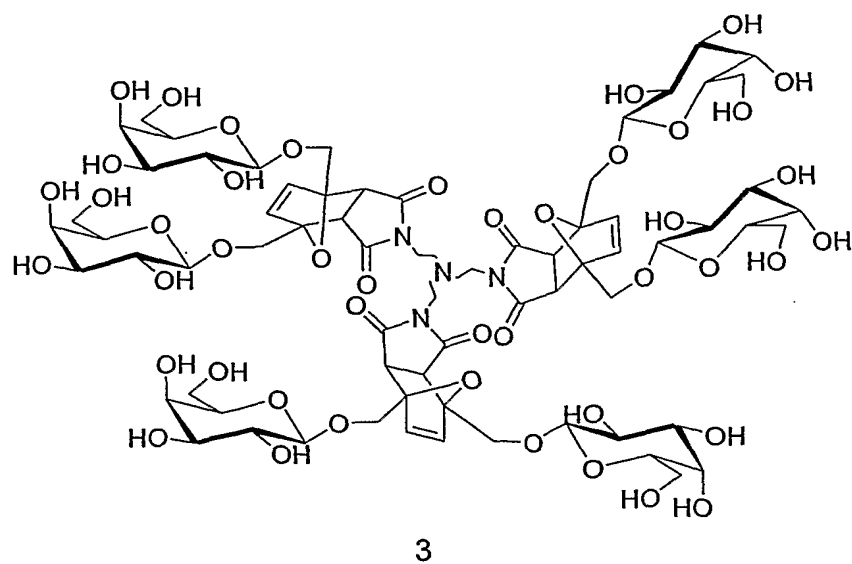
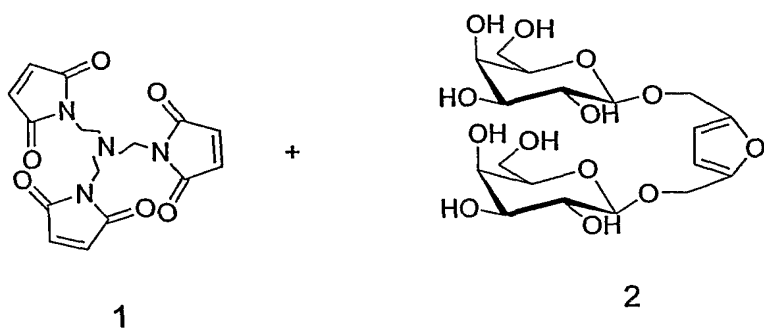
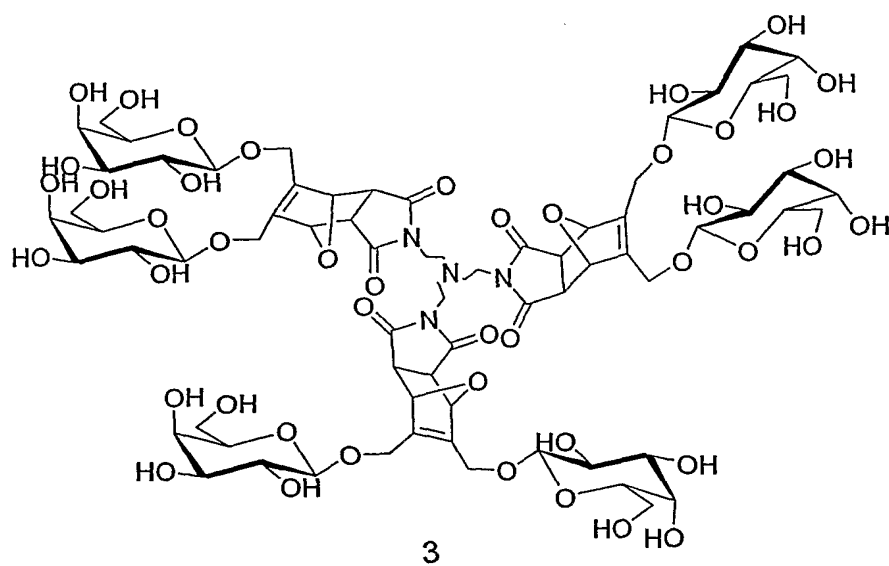
Beispiel 4:

Darstellung von Glycoclustern mittels Diels-Alder Reaktion





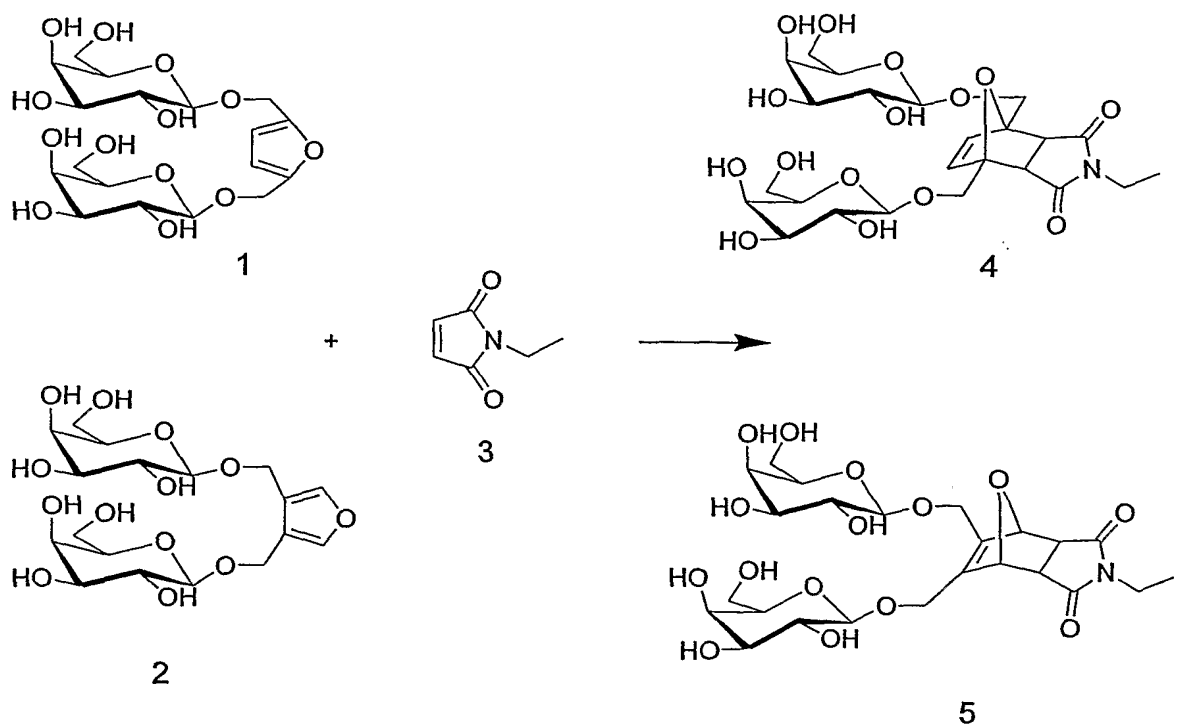
24



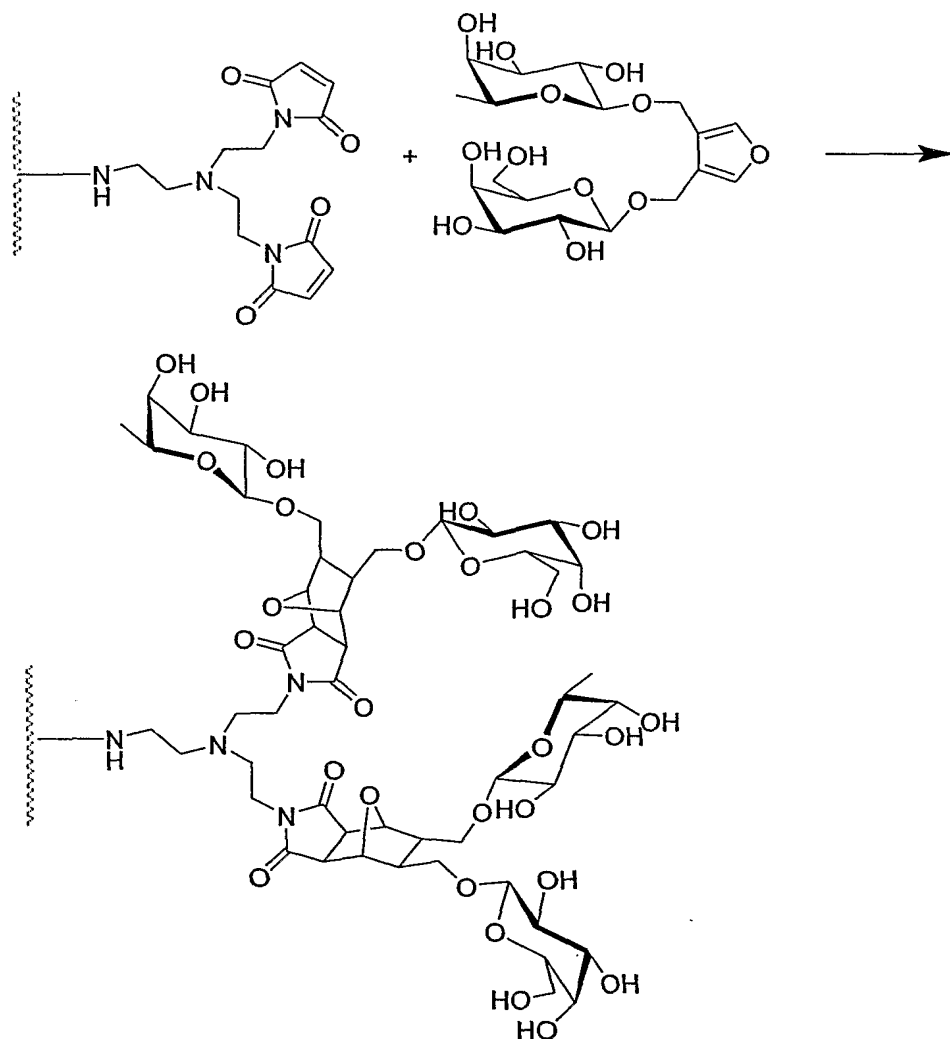
Eine Lösung von 50  $\mu\text{mol}$  Tris(-2-Maleinimidoethyl)amin **1** (TMEA) und 190  $\mu\text{mol}$  Bis-Galactosylfuran **2** in 1 ml Wasser wird 50 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produktgemisch **3** (Kombination aus endo- und exo-Produkten) wird mittels HPLC in ca. 30% Ausbeute erhalten.

Beispiel 5: Gekreuzte Diels-Alder Reaktion

Hierbei handelt es sich um die gleichzeitige Reaktion von 2,5- und 3,4-Furanen mit einem Dienophil ( $\rightarrow$  Kombinatorik)



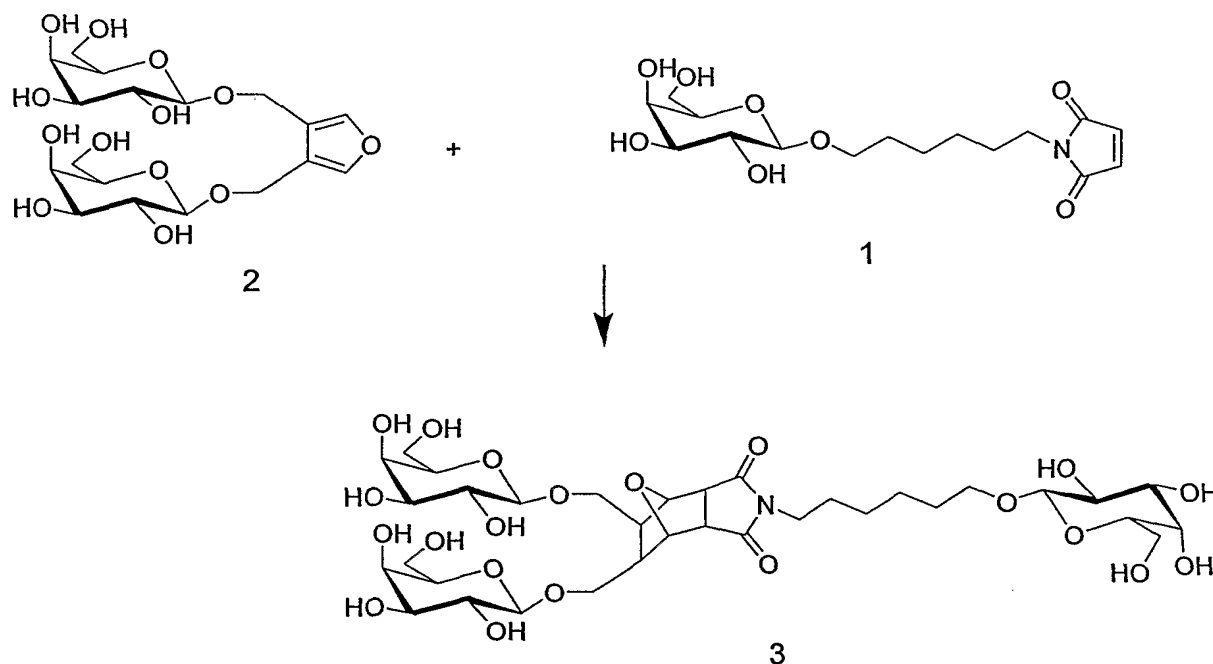
50  $\mu$ mol eines Gemischs der glycosidierten 3,4- und 2,5-Furane 1, 2 (s. Beispiel 1) und 50  $\mu$ mol N-Ethyl-Maleinimid 3 werden in 1 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird mittels HPLC kontrolliert. Nach beendeter Umsetzung wird die Reaktionslösung gefriergetrocknet. Die Produkte 4 und 5 werden mittels präparativer HPLC isoliert. Ausbeute 50-60%.

Beispiel 6: Diels-Alder Reaktion an der Festphase

1,0 g Tris-(2-aminoethyl)amin-Polymer (Aldrich #47,210-7) werden in 20 ml Wasser für 1 Std. quellen gelassen. Danach wird in 20 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  - Lösung aufgeschlämmt und bei  $0^\circ\text{C}$  mit 1080 mg Methoxycarbonylmaleimid versetzt und dann bei Raumtemperatur 16 Std. gerührt. Man stellt mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf pH 3-4 ein, extrahiert mit Essigester und Dichlormethan. Die wässrige Phase wird getrocknet. Zu 100 mg des Produktes werden 108 mg glykosyliertes Furanderivat (s. Beispiel 1) in

3 ml Wasser gegeben. Es wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wird das Wasser entfernt und das Produkt mittels HPLC gereinigt.

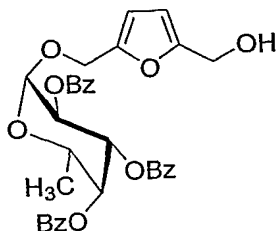
Beispiel 7: Herstellung von Trisacchariden



5 mmol geeignet derivatisiertes Maleinimid 1 (Maleinimid + Spacer + Saccharid) werden mit 4.9 mmol diglycosyliertem Furan 2 in 100 ml Dichlormethan gelöst und bei  $-40^{\circ}\text{C}$  mit 10 Tropfen Triflat versetzt. Es wird bei  $0^{\circ}\text{C}$  gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird die Reaktionslösung mit verdünnter Bicarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1) chromatographiert. Ausbeute an Produkt 3: 54%.

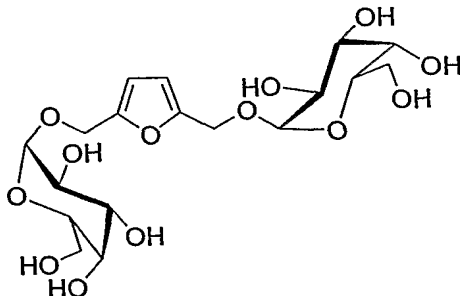
## Beispiel 8: Glycosidierung von Furanderivaten mit Hydroxyfunktionen

### (a) Verfahren A: Monoglycosidierung:



2,5-Bishydroxymethylfuran (2 mmol, 265 mg) und 2,3,4-Tri-O-Benzoylfucoseimidat (2 mmol, 1,28g) werden in 50 ml Dichlormethan bei  $-40^{\circ}\text{C}$  mit 5 Tropfen Triflat versetzt und anschließend bei  $0^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von verdünnter wässriger Bicarbonatlösung gestoppt. Die organische Phase wird mit 20 ml Wasser gewaschen und anschließend nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird an Kieselgel (Petrolether/Essigester: 2/1) chromatographiert. Ausbeute: 700mg (60%); ESI-MS:  $[M+H^+]$ : 58611. Diese Verbindung kann nun in einer zweiten Reaktion nochmals mit einem Äquivalent eines beliebigen Saccharidimidates umgesetzt werden.

### (b) Verfahren B: Mehrfachglycosidierung



2,5-Bishydroxymethylfuran (2 mmol, 265 mg) und 2,3,4,6-Tetra-O-Benzoylgalctoseimidat (4 mmol, 1,48g) werden in 50 ml Dichlormethan bei  $-40^{\circ}\text{C}$  mit 5 Tropfen Triflat versetzt und

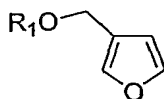
anschließend bei 0°C für zwei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von verdünnter wässriger Bicarbonatlösung gestoppt. Die organische Phase wird mit 20 ml Wasser gewaschen und anschließend nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel (Petrolether/Essigester: 2/1) chromatographiert. Ausbeute: 1,4g (55%); ESI-MS:  $[M+H^+]$ : 1284,3

Zur Abspaltung der Schutzgruppen werden die Verbindungen in methanolischer Lösung mit Natriummethanolat umgesetzt. Die Verseifung erfolgt quantitativ.

Enthält das Furanderivat mehrere glycosidierbare Hydroxylfunktionen, so wird zur schrittweisen Glycosidierung nach Verfahren A umgesetzt. Soll hingegen nur eine Kohlenhydratspezies an alle zur Verfügung stehenden Hydroxylfunktionen konjugiert werden, wird Verfahren B eingesetzt.

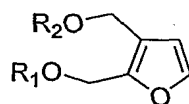
Auf diese Weise wurden folgende Furanderivate hergestellt:

3-Hydroxymethylfuranglycosid



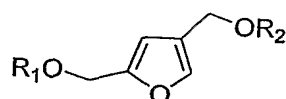
R <sub>1</sub>
Glucose

## 2,3-Bishydroxymethylfuranglycoside



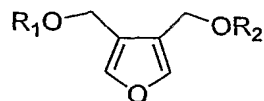
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Fucose	OH
Galactose	OH
Fucose	Fucose
Galactose	Galactose

## 2,4-Bishydroxymethylfuranglycoside



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
OH	Fucose
Fucose	Fucose
Galactose	Galactose

## 3,4-Bishydroxymethylfuranglycoside

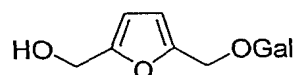


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Fucose	OH
Galactose	OH
Fucose	Fucose
Galactose	Galactose
Galactose	Fucose
Lactose	Lactose
Glucose	Glucose



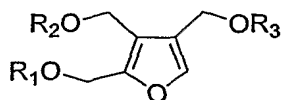
Sialinsäure	OH
Sialinsäure	Fucose
Sialinsäure	Sialinsäure

## 2,5-Bishydroxymethylfuranglycoside



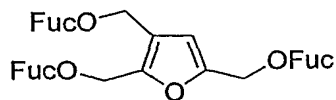
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Fucose	OH
Galactose	OH
Glucose	OH
Fucose	Fucose
Galactose	Galactose
Galactose	Fucose
Lactose	Lactose
Glucose	Glucose
Sialinsäure	OH
Sialinsäure	Fucose
Sialinsäure	Sialinsäure

## 2,3,4-Trishydroxymethylfuranglycoside



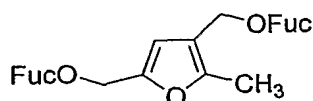
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Galactose	Galactose	Galactose
Fucose	Fucose	Fucose

## 2,3,5-Trishydroxymethylfuranglycosid



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Fucose	Fucose	Fucose

Andere:



#### Beispiel 9: Darstellung von Dienophilen

Zahlreiche Dienophile vom Maleinimidtyp sind synthetisiert worden. Daneben sind jedoch auch einige kommerziell erhältlich.

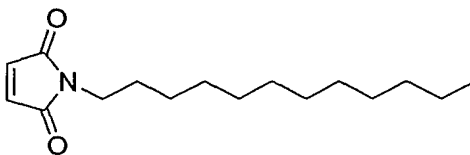
#### Allgemeine Maleinimid-Synthesen:

Synthese des N-(methoxycarbonyl)-maleinimids: O. Keller, J. Rudinger, Hel. Chim. Acta 1975, 58, 531541.

J. T. Elliott, G. D. Prestwich, Bioconjugate Chemistry 2000, 11, 832-841.

S. Kalgutkar, B. C. Crews, L. J. Marnett, J. Med. Chem. 1996, 39, 1692-1703.

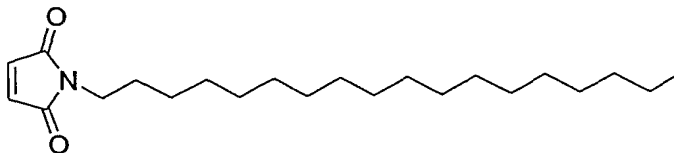
M. Dörr, R. Zentel, R. Dietrich, K. Meerholz, C. Bräuchle, J. Wichern, S. Zippel, P. Boldt, Macromolecules 1998, 31, 1454-1465.

**- N-Dodecyl-maleinimid**

300 mg (1.62 mmol) Dodecylamin werden in 10 ml  $\text{CHCl}_3$  gelöst und auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Man versetzt mit N-methoxycarbonyl-maleinimid (NMM, 507 mg, 3.24 mmol) und tetrabutylammonium hydrogensulfat (503 mg, 1.48 mmol). Man versetzt langsam mit Triethylamin (0.3 ml, 2.16 mmol) und läßt noch weitere 10 min bei  $0^\circ\text{C}$  rühren. Das Eisbad wird entfernt und man gibt 20 ml gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zu. Nach 3 h bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 50 ml). Die vereinigten organischen Extrakte werden einmal mit ges.  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das N-dodecylamin wird anschließend durch Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Petrolether/EtOAc 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 365 mg (85 %)

$^1\text{H NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.88 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 3H), 1.25 (br. s., 16H), 1.54–1.60 (m, 4 H), 3.50 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 6.67 (s, 2H).

**- N-Stearyl-malinimid**

500 mg (1.85 mmol) Stearylamin werden in 10 ml  $\text{CHCl}_3$  gelöst und auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Man versetzt mit N-methoxycarbonyl-maleinimid (NMM, 580 mg, 3.71 mmol) und tetrabutylammonium hydrogensulfat (574 mg, 1.69 mmol). Man versetzt langsam mit Triethylamin (0.34 ml, 2.46 mmol) und läßt noch weitere 10

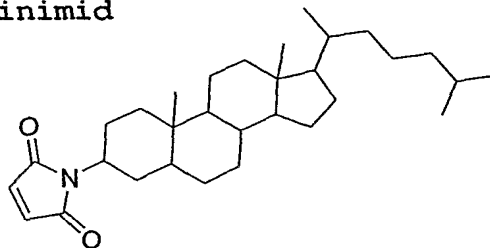
min bei 0 °C rühren. Das Eisbad wird entfernt und man gibt 20 ml gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zu. Nach 3 h bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 50 ml). Die vereinigten organischen Extrakte werden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das N-Stearylamin wird anschließend durch Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Petrolether/EtOAc 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 515 g (80 %)

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 1.25 (br. s., 28H), 1.50-1.60 (m, 4H), 3.50 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 6.67 (s, 2H).

ESI-MS: [M+H<sup>+</sup>] 350.0

- N-Cholesteryl-maleinimid



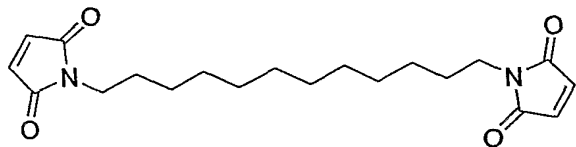
Cholesterylamin (1.0 g, 2.58 mmol) wird in CHCl<sub>3</sub> (50 ml) gelöst und mit Maleinsäureanhydrid (253 mg, 2.58 mmol) versetzt. Man läßt über Nacht rühren und entfernt anschließend das Lösungsmittel i. Vak.. Der Rückstand wird in Essigsäureanhydrid aufgenommen (30 ml) und mit Natriumacetat (300 mg) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei 100 °C gerührt anschließend auf 100 ml Eiswasser gegossen. Es wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 100 ml) und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen (1 x 100 ml). Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird durch Chromatographie an Kieselgel (Petrolether/EtOAc

7:1) aufgereinigt. Das N-Cholesteryl-maleinimid wird als farbloses Öl erhalten.

ESI-MS: [M+H<sup>+</sup>] 468.3

Synthese des Cholesterylamins: R. Krieg, R. Wyrwa, U. Möllemann, H. Görls, B. Schönecker, Steroids, 1998, 63, 531-541; M. Hasan, N. Rashid, K. M. Khan, G. Snatzke, H. Duddeck, W. Voelter, Liebigs Ann. 1995, 889-896.

- Bis-maleinimid

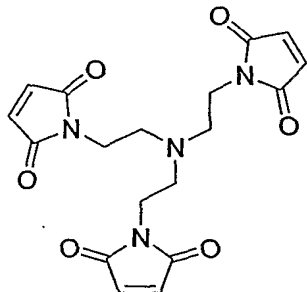


300 mg (1.49 mmol) 1,2 Diaminododecan werden in 10 ml CHCl<sub>3</sub> gelöst und auf 0°C gekühlt. Man versetzt mit N-methoxycarbonyl-maleinimid (NMM, 702 mg, 4.49 mmol) und tetrabutylammonium hydrogensulfat (508 mg, 1.49 mmol). Man versetzt langsam mit Triethylamin (0.5 ml, 3.97 mmol) und läßt noch weitere 10 min bei 0°C rühren. Das Eisbad wird entfernt und man gibt 20 ml gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zu. Nach 3 h bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 50 ml). Die vereinigten organischen Extrakte werden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das gewünschte Bis-maleinimid wird anschließend durch Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Petrolether/EtOAc 10:1) und als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 420 mg (78 %)

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.25 (br.s., 16H), 1.54–1.59 (m, 4H), 3.50 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 4H), 6.68 (s, 2H).

- Tris-Maleiminimid



Tris-(2-aminoethyl)amin (100 mg, 0.68 mmol) wird in 5 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg/THF (1:1) gelöst. Bei  $0^\circ\text{C}$  versetzt man portionsweise mit N-(methoxycarbonyl)maleiminid (641 mg, 4.13 mmol). Nach jeder Stunde wird 20 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg/THF (1:1) zugegeben. Nach 4 h bei  $0^\circ\text{C}$  extahiert man mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) und wäscht die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (1 x 100 ml). Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Man erhält die gewünschte Verbindung als hellgelben Feststoff.

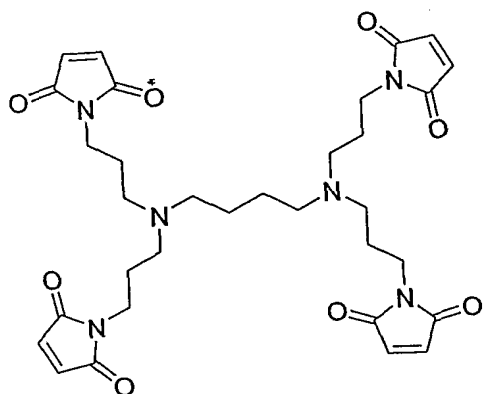
Ausbeute: 140 mg

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.71 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 6H), 3.52 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 6H), 6.70 (s, 6H).

ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}^+]$  386.9

Synthese des Tris-maleiminids: J. C. Cheronis, E. T. Whalley, K. T. Nguyen, S. R. Eubanks, L. G. Allen, M. J. Duggan, S. D. Loy, K. A. Bonham, J. K. Blodgett, J. Med. Chem. 1992, 35, 1563–1572.

- Tetra-maleiminid



Polypropylenimin-tetraamin Dendrimer (DAB-Am-4, 90 mg, 0.28 mmol) wird in 5 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg/THF (1:1) gelöst. Bei  $0^\circ\text{C}$  versetzt man portionsweise mit N-(methoxycarbonyl)maleinimid (356 mg, 2.27 mmol). Nach jeder Stunde wird 20 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ /THF-Lsg (1:1) zugegeben. Nach 4 h bei  $0^\circ\text{C}$  extrahiert man mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) und wäscht die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (1 x 100 ml). Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Man erhält die gewünschte Verbindung als hellgelben Feststoff.

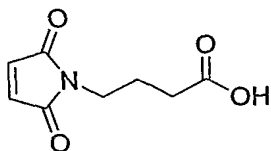
Ausbeute: 120 mg

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.42-1.43 (m, 4H), 1.69 (dt,  $J$  = 7.2,  $J$  = 7.2 Hz, 8H), 2.37-2.40 (m, 4H), 2.40 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 8H), 3.55 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 8H), 6.68 (s, 8H).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz):  $\delta$  = 24.76, 26.16, 36.31, 51.24, 53.68, 134.04, 170.76.

ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  637.2

#### - N-Maleinimido-butansäure

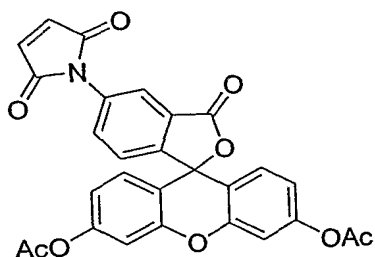


$\delta$ -Aminocarbonsäure (500 mg, 4.84 mmol) wird in 20 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg/THF (1:1) gelöst. Bei  $0^\circ\text{C}$  versetzt man portionsweise mit N-(methoxycarbonyl)maleinimid (910 mg, 5.81

mmol). Nach 10 min bei 0 °C läßt man auf Raumtemperatur erwärmen und gibt jede Stunde 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>/THF-Lsg (1:1) zu. Nach 3 h extrahiert man mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) und wäscht die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (1 x 100 ml). Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Chromatographie an Kieselgel (EtOAc) liefert die gewünschte Verbindung als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 798 mg (90 %)

- 5-Maleimido-fluorescein



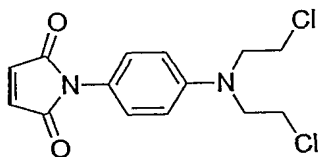
5-Aminofluorescein (500 mg, 1.44 mmol) wird in 50 ml Essigsäure/Chloroform (1:1) gelöst (evtl. Suspension). Bei Raumtemperatur versetzt man mit Maleinsäureanhydrid (141 mg, 1.43 mmol) und läßt über Nacht rühren. Anschließend entfernt man das Lösungsmittel i. Vak. Und nimmt den Rückstand in Essigsäureanhydrid (30 ml) auf. Man gibt Natriumacetat (200 mg) zu und erhitzt 4 h auf 100 °C. Die Reaktionsmischung wird auf 100 ml Eiswasser gegossen und mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) extrahiert. Die organische Phase wird einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand an Kieselgel (EtOAc/Hexan 3:1) chromatographiert.

Ausbeute: 590 mg

ESI-MS: [M+H<sup>+</sup>] 512.0



- N,N-Bis(2-chloroethyl)-4-maleinimidoanilin



N,N-Bis(2-chloroethyl)-4-nitroanilin (1.8 g, 6.87 mmol) wird in Methanol (40 ml) gelöst und mit 10 % Pd/C (200 mg) versetzt. Die Reaktionsmischung wird unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei Normaldruck für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in 30 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>/THF-Lösung (1:1) aufgenommen und bei 0 °C portionsweise mit N-methoxycarbonyl)-maleinimd (1.61 g, 10.0 mmol) versetzt. Nach 10 min. entfernt man das Eisbad und läßt 3 h bei Raumtemperatur rühren. Nach jeder Stunde gibt man 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>/THF-Lösung (1:1) zu. Die Reaktionsmischung wird mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) extrahiert und die vereinigten organische Phasen mit ges. NaCl-Lösung (1 x 100 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (1:1) chromatographiert. Die gewünschte Verbindung wird als orangefarbenen Feststoff erhalten.

Ausbeute: 600 mg (28 %)

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.59-3.77 (m, 8H), 6.73 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.80 (s, 2H), 7.17 (d, J = 9.2 Hz, 2H).

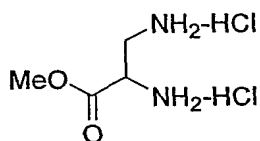
<sup>13</sup>C NMR (63 MHz): δ = 40.24, 53.49, 112.22, 120.93, 127.84, 134.09, 145.86, 169.91.

ESI-MS: war nicht möglich

Synthese des N,N-Bis(2-chloroethyl)-4-nitroanilins: B. D. Palmer, W. R. Wilson, S. M. Pullen, W. A. Denny, J. Med. Chem. 1990, 33, 112-121.

- Synthese eines cis-Platin Maleinimid-Derivates

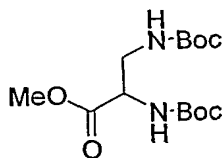
2,3-Diaminopropionsäuremethylester Dihydrochlorid



2,3-Diaminopropionsäure monohydrochlorid (2.0 g, 14.3 mmol) wird in trockenem Methanol (80 ml) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Trockenem HCl-Gas wird 30 min in die Lösung eingeleitet. Man läßt 48 h bei Raumtemperatur rühren und entfernt anschließend das Lösungsmittel i. Vak.. Die gewünschte Verbindung wird als farbloser Feststoff erhalten und direkt für die nächste Umsetzung verwendet.

Synthese des 2,3-Diaminopropionsäuremethylester Dihydrochlorids: P. Jones, G. B. Villeneuve, C. Fei, J. DeMarte, A. J. Haggarty, K. T. Nwe, D. A. Martin, A.-M. Lebuïs, J. M. Finkelstein, B. J. Gour-Salin, T. H. Chan, B. R. Leyland-Jones, J. Med. Chem. 1998, 41, 3062-3077.

- N,N-Di-tert-butoxycarbonyl-2,3-diaminopropionsäuremethylester



2,3-Diaminopropionsäuremethylester Dihydrochlorid (1.2 g, 6.31 mmol) wird in 1,4-Dioxan/Wasser (40 ml, 1:1) gelöst und

mit Triethylamin (4.4 ml, 31.61 mmol) versetzt. Anschließend gibt man Di-tert-butyl dicarbonat (3.0 g, 13.78 mmol) zu und läßt über Nacht rühren. Man gibt Essigsäureethylester (100 ml) und 1 N HCl (100 ml) zu der Reaktionsmischung. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen (2 x 100) und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel und reinigt den Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel (EtOAc/Hexan 1:3). Die gewünschte Verbindung wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.83 g (91 %)

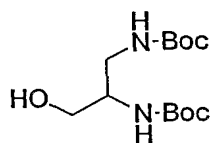
$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 1.36 (br. s, 18H, Boc-H), 3.20-3.25 (m, 2H), 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.03 (t, J = 7.0 Hz, CH), 6.78 (br. t, NH), 6.98 (d, J = 7.6 Hz, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 28.10, 40.97, 52.39, 61.24, 77.52, 77.58, 155.15, 155.84.

ESI-MS: [M+Na<sup>+</sup>] 341.1; [M+H<sup>+</sup>] 319.1

Methode: E. B. van der Tol, H. J. van Ramesdonk, J. W. Verhoeven, F. J. Steemers, E. G. Kerver, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, Chem. Eur. J. 1998, 4, 2315-2323.

- N,N-Di-tert-butoxycarbonyl-2,3-diaminopropanol



N,N-Di-tert-butoxycarbonyl-2,3-diaminopropionsäuremethylester (1.5 g, 4.70 mmol) wird in trockenem THF (30 ml) gelöst. Bei 0 °C gibt man portionsweise einen Überschuß Lithiumaluminiumhydrid (150 mg) zu und läßt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und durch Zugabe von Wasser hydrolysiert. Man extrahiert mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) und wäscht

mit ges. NaCl-Lösung (1 x 100 ml). Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und der Rückstand an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (1:1) chromatographiert. Der Alkohol wird als farbloser Feststoff erhalten.

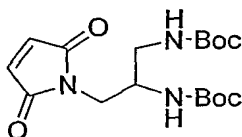
Ausbeute: 966 mg (70 %)

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 1.37 (br. s, 18H, Boc-H), 2.94-3.06 (m, 2H), 3.30 (dd,  $J$  = 5.5 Hz,  $J$  = 9.5 Hz, 2H), 3.40-3.46 (m, 1H, CH), 4.50 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, OH), 6.23 (br. d, 1H, NH), 6.57 (br. t, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 28.10, 40.97, 52.39, 61.24, 77.52, 77.58, 155.15, 155.84.

ESI-MS: [M+Na<sup>+</sup>] 312.9; [M+H<sup>+</sup>] 290.9

- N,N-Di-tert-butoxycarbonyl-2,3-diaminopropyl-maleinimid



N,N-Di-tert-butoxycarbonyl-2,3-diaminopropanol (400 mg, 1.38 mmol) wird in trockenem THF gelöst und mit Triphenylphosphin (398 mg, 1.52 mmol) und Maleinimid (148 mg, 1.52 mmol) versetzt. Anschließend gibt man tropfenweise DEAD (0.26 ml, 1.67 mmol) zu und läßt 24 h bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand zweimal an Kieselgel mit Hexan/EtOAc 2:1 chromatographiert. Die gewünschte Verbindung wird als farbloser Feststoff, jedoch nicht rein erhalten. Auch eine Trennung mittel HPLC brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Ausbeute: 50 mg

ESI-MS: [2M+Na<sup>+</sup>] 761.2; [M+Na<sup>+</sup>] 392.0; [M+H<sup>+</sup>] 370.1.

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.39 (br. s, 9H, Boc-H), 1.44 (br. s, 9H, Boc-H), 3.22 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 3.61 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 3.80–3.88 (m, 1H), 5.00–5.15 (m, 2H, NH), 6.72 (s, 2H).

Mitsunobu-Reaktionen mit Maleinimid:

M. A. Walker, Tetrahedron Lett. 1994, 35, 665–668.

M. A. Walker, J. Org. Chem. 1995, 60, 5352–5355.

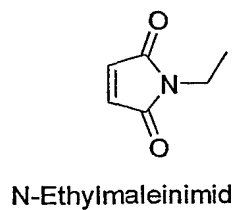
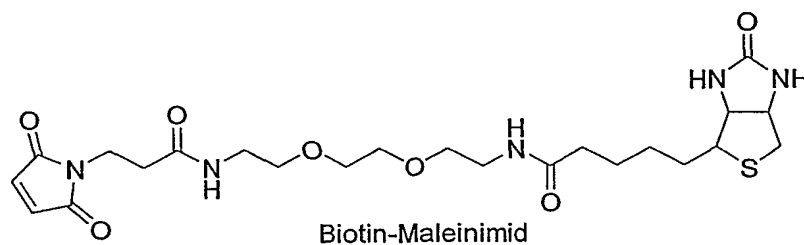
M. A. Walker, Tetrahedron 1997, 53, 14591–14598.

K. I. Booker-Milburn, C. E. Anson, C. Clissold, N. J. Costin, R. F. Dainty, M. Murray, D. Patel, A. Sharpe, Eur. J. Org. Chem. 2001, 1473–1482.

Mitsunobu-Reaktionen mit Scavenger-Reagenzien:

L. D. Arnold, H. I. Assil, J. C. Verderas, J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 3973–3976.

Kommerziell erhältliche Maleimidderivate, die in der Diels-Alder Reaktion erfolgreich eingesetzt wurden:



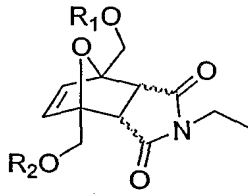
#### Beispiel 10: Diels-Alder-Reaktionen

Alle gezeigten Verbindungen wurden nach der allgemeinen Vorschrift hergestellt und per HPLC gereinigt. Sie wurden mindestens durch ESI-Massenspektren, häufig zusätzlich durch NMR ( $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ ) charakterisiert.

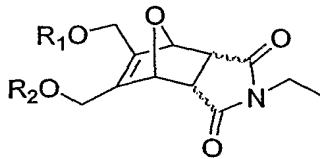
#### **Allgemeine Vorschrift:**

Das Furan-Derivat wird mit dem entsprechenden Maleinimid-Derivat in Wasser oder wenn nötig in einem Gemisch aus THF/Wasser (5:2) gelöst und mehrere (2-4) Tage bei 50 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5:1) aufgereinigt. Die entsprechenden Diels-Alder Addukte wurden als Gemische der exo-/endo- erhalten und konnten zum Teil aufgetrennt werden.

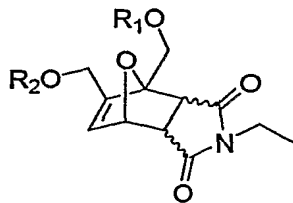
- Synthetisierte Diels-Alderprodukte mit N-Ethylmaleinimid als Dienophil:



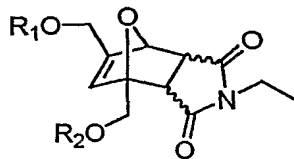
$R_1 / R_2$  : Fucose/Fucose, Galactose/Galactose und Fucose/Galactose



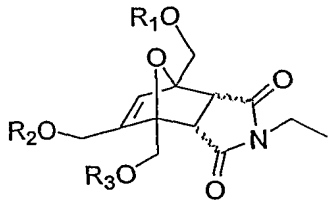
$R_1 / R_2$  : H/H; H/Galactose; H/Fucose; Fucose/Fucose, Galactose/Galactose und Fucose/Galactose, Lactose/Lactose



$R_1 / R_2$  : ; Fucose/Fucose, Galactose/Galactose

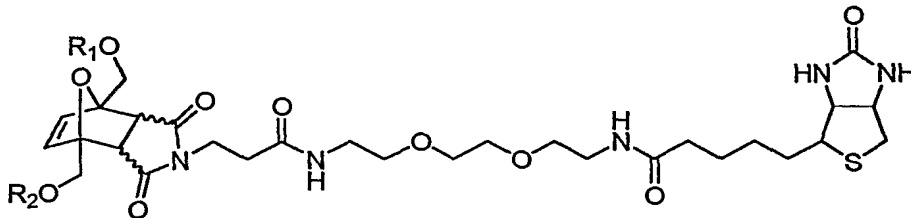


$R_1 / R_2$  : ; Fucose/Fucose, Galactose/Galactose



$R_1 / R_2 / R_3$ : ; Fucose/Fucose/Fucose

- Synthetisierte Diels-Alderprodukte mit Biotin-Maleinimid als Dienophil:

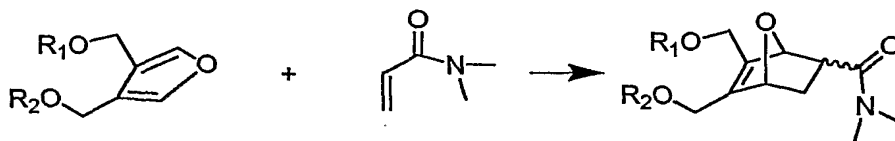


$R_1 / R_2$  : Fucose/Fucose, Galactose/Galactose und Fucose/Galactose

Verbindungen mit Biotin-Maleinimid eignen sich besonders zur Aufklärung von zellulären Oberflächenstrukturen und deshalb für die Diagnostik und Therapie.

- Andere synthetisierte Diels-Alderprodukte:

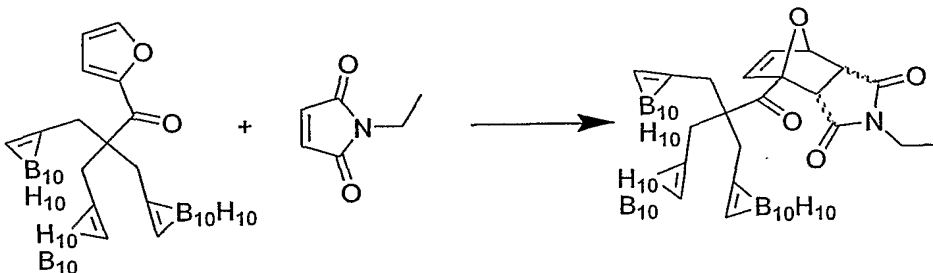
Acrylamid als Dienophil



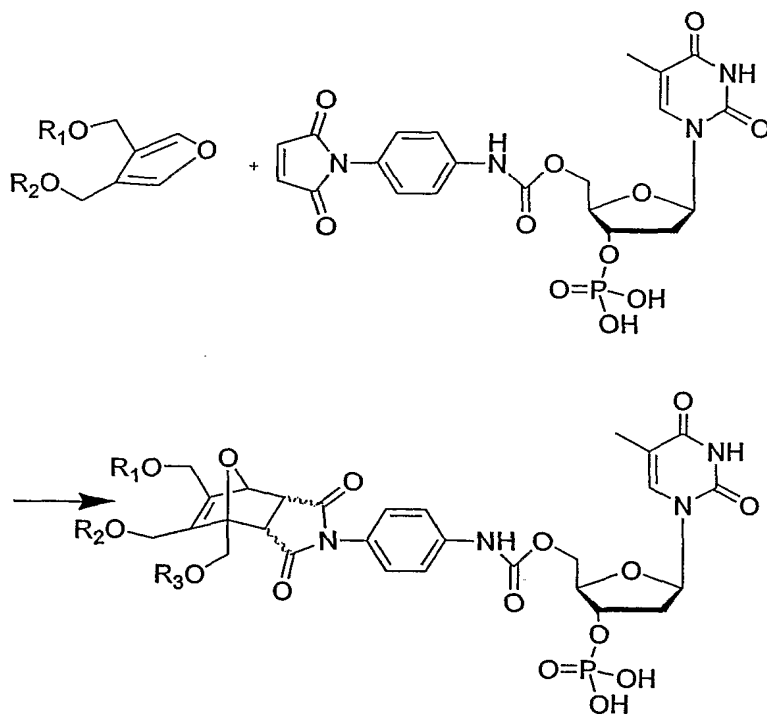
$R_1 / R_2$  : Fucose/Fucose



- Einführung von Carboran-derivatisiertes Furan und N-Ethylmaleinimid



- Diels-Alder Reaktion mit Nukleosiden (Als Beispiel für Diels-Alder-Reaktion an Oligonukleotiden, DNA)

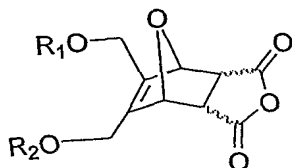




Diese Reaktion wurde auch mit zweifach Fucosylierten oder galactosylierten 3,4- und 2,5-Bishydroxymethylfuranen erfolgreich durchgeführt.

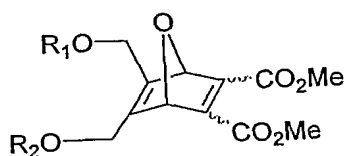
Bei beiden vorstehenden Verbindungen ist ein kombinatorischer Ansatz erfolgt. So lassen sich durch Kombination verschiedenartig glycosylierter Furane mit unterschiedlich substituierten Maleinimiden kleinere Bibliotheken neuartiger, potentieller Arzneimittel, z.B. als Modulatoren von/für p53 herstellen.

**- Diels-Alder-Produkt mit Maleisäureanhydrid**



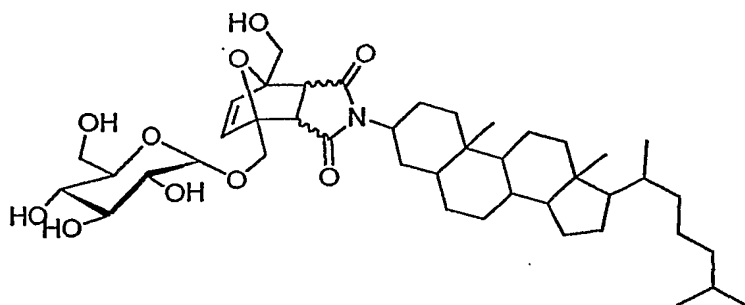
R<sub>1</sub>/R<sub>2</sub>: Fucose/Fucose

Und ein Derivat davon:



Bei den folgenden vier Reaktionen wurde als Furanderivat das 2-Glucosylmethyl-5-hydroxymethylfuran eingesetzt.

**- mit Cholesterin**



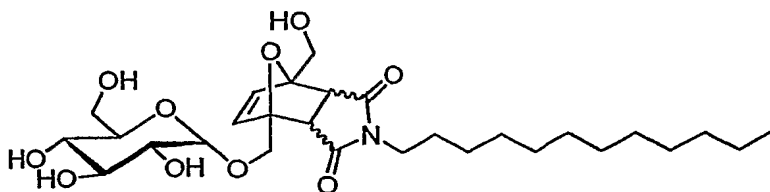
Ansatz: 240 mg (0.82 mmol) Furan

530 mg (1.13 mmol) N-Cholesteryl-maleinimid

Ausbeute: 250 mg (44 %)

ESI-MS: [M+Cl<sup>-</sup>] 792.7

- Dodecan (lipophiler Rest)



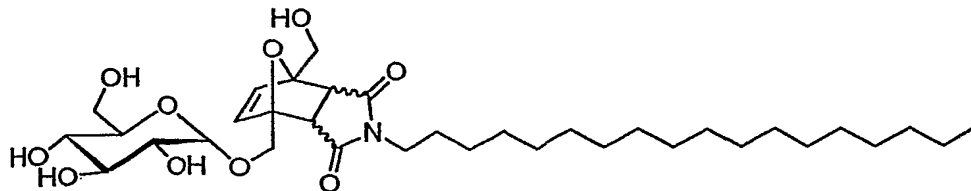
Ansatz: 200 mg (0.69 mmol) Furan

365 mg (1.38 mmol) N-Dodecyl-maleinimid

Ausbeute: 210 mg (55 %)

ESI-MS: [M+Na<sup>+</sup>] 578.0

- Sterylrest (lipophiler Rest)



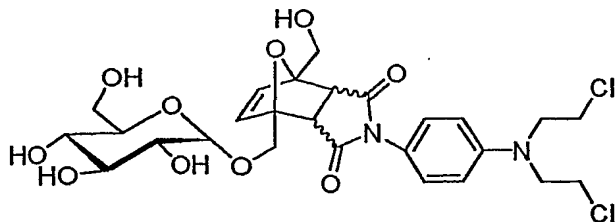
Ansatz: 200 mg (0.69 mmol) Furan

300 mg (0.86 mmol) N-Stearyl-maleinimid

Ausbeute: 230 mg (52 %)

ESI-MS: [M+Cl<sup>-</sup>] 674.5

## - Anilinlost (analog Glu-IPM)



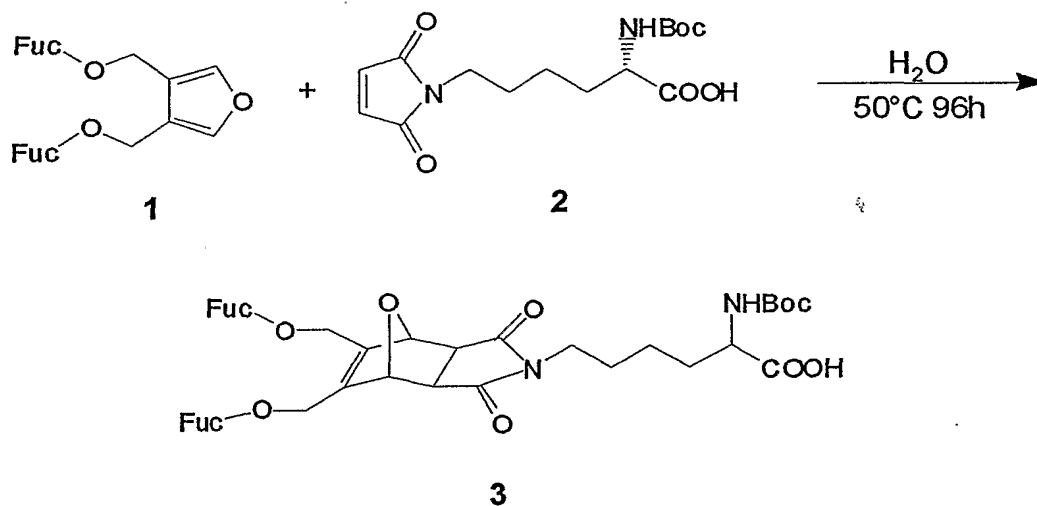
Ansatz: 100 mg (0.34 mmol) Furan

215 mg (0.68 mmol) Anilin-N-Lost  $\gamma$ -maleinimid

Ausbeute: < 50 mg

ESI-MS: [M+Na+] 625.0

Beispiel 11: Diels-Alder-Reaktion mit einer Aminosäure  
(Lysin)



2-tert-Butoxycarbonylamino-6-[3,5-dioxo-8,9-bis-(3,4,5-trihydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-yloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.2,6]dec-4-yl]-hexanoic acid (3):

Zu einer Lösung von 0,042 g (0,1 mmol) 1 in 3ml Wasser, welches auf pH=6,9 eingestellt ist, werden 0,033 g (0,1 mmol) 2 (nach der Vorschrift [1] hergestellt) hinzugegeben und anschliessend 4 Tage bei 50°C gerührt. Das Lösungsmittel wird durch Gefriertrocknung entfernt und das weisse Rohprodukt (0,075 g) mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Es werden dabei 12 mg und 16 mg zweier Konformerer erhalten. Gesamtausbeute 40%. ESI-MS: 647,2 [(MH-Boc)+H]<sup>+</sup>, 669,1 [(MH-Boc)+Na]<sup>+</sup>, 769,2 [M+Na]<sup>+</sup>, 1293,3 [2(MH-Boc)+H]<sup>+</sup>, 1315,4 [2(MH-Boc)+Na]<sup>+</sup>

HPLC: Abimed.:

analytisch: Merck Lichrospher-RP18(E) 5μ, (250x4) mm,  
Wasser:CH<sub>3</sub>CN (100:0)% Grad 40 min 100% CH<sub>3</sub>CN, 1 ml/min Fluss,  
detektion bei 210 nm

präparativ: Merck Lichrospher-RP18(E) 5μ, (250x25) mm,  
Wasser:CH<sub>3</sub>CN (100:0)% Grad 45 min 25% CH<sub>3</sub>CN, 10 ml/min Fluss,  
Detektion bei 210 nm

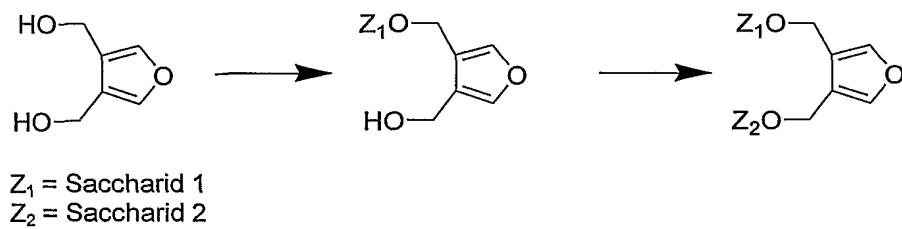
## Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Saccharid-Verbindungen, das die folgenden Schritte aufweist:
  - (a) Anknüpfung mindestens eines Saccharids an ein cyclisches oder acyclisches Dien,
  - (b) Umsetzung des in Schritten (a) entstandenen Saccharid-enthaltenden Diens oder eines käuflich erhältlichen Saccharid-enthaltenden Diens mit einem Dienophil mittels Diels-Alder-Reaktion.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Dien ein substituiertes Furan, Fulven, Furfural, Pyrrol, Pyrazol, Oxazol, Thiophen, Cyclopentadien, Cyclohexadien oder acyclisches 1,3-Dien ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Dienophil ein Maleinsäure(anhydrid)-Derivat, Fumarsäure(anhydrid)-Derivat, Maleinimid-Derivat, Acrylsäure-Derivat, Acetylen-Derivat oder ein Enolether ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Dien und/oder Dienophil als Substituenten Alkylketten, OH, SH, Halogene, Aryl-, Carboxyl-, Nitro-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure-, Amino-Gruppen, Aminosäuren- bzw. Peptid-Substituenten, Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäure-Substituenten, Lipid-Substituenten, Saccharide, pharmazeutische Wirkstoffe, Markierungen, Komplexe oder Farbstoffe tragen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei in Schritt (a) das Saccharid mit dem cyclischen Dien

verknüpft wird, indem das Dien mit einer Imidat-Komponente umgesetzt wird, die mit einem Saccharid substituiert ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Dien eine cyclisches Dien ausgewählt aus 2,3-Bishydroxymethylfuran, 3,4-Bishydroxymethylfuran, 2,5-Bishydroxymethylfuran oder ein Derivat von  $\alpha$ -GMF mit modifizierter Aldehydfunktion ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das mit einem Saccharid modifizierte Imidat Tri-O-Benzoyl-fucoseimidat oder Tetra-O-Benzoyl-galactoseimidat ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das in Schritt a) erhaltene Produkt 3,4-Bis-(fucosyl-oxymethyl)-furan, 3,4-Bis-(galactosyl-oxymethyl)-furan, 3-galactosyl-hydroxymethyl-4-fucosyl-hydroxymethylfuran, 3-Fucosyl-4-fucosyl-3,4-bis-hydroxymethylfuran, 3-Fucosyl-4-galactosyl-3,4-bis-hydroxymethylfuran, 2-Galactosyl-5-galactosyl-2,5-bis-hydroxymethylfuran oder 2,5-Bis-(galactosyl-oxymethyl)-furan ist.
9. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Substituent ein Biotinrest oder ein Lysinrest ist.

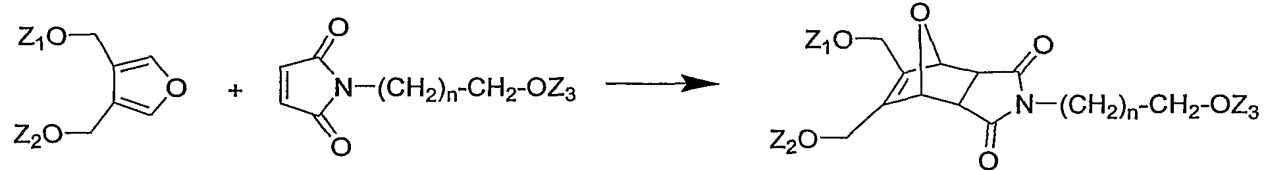


**Figur 1**

2/12

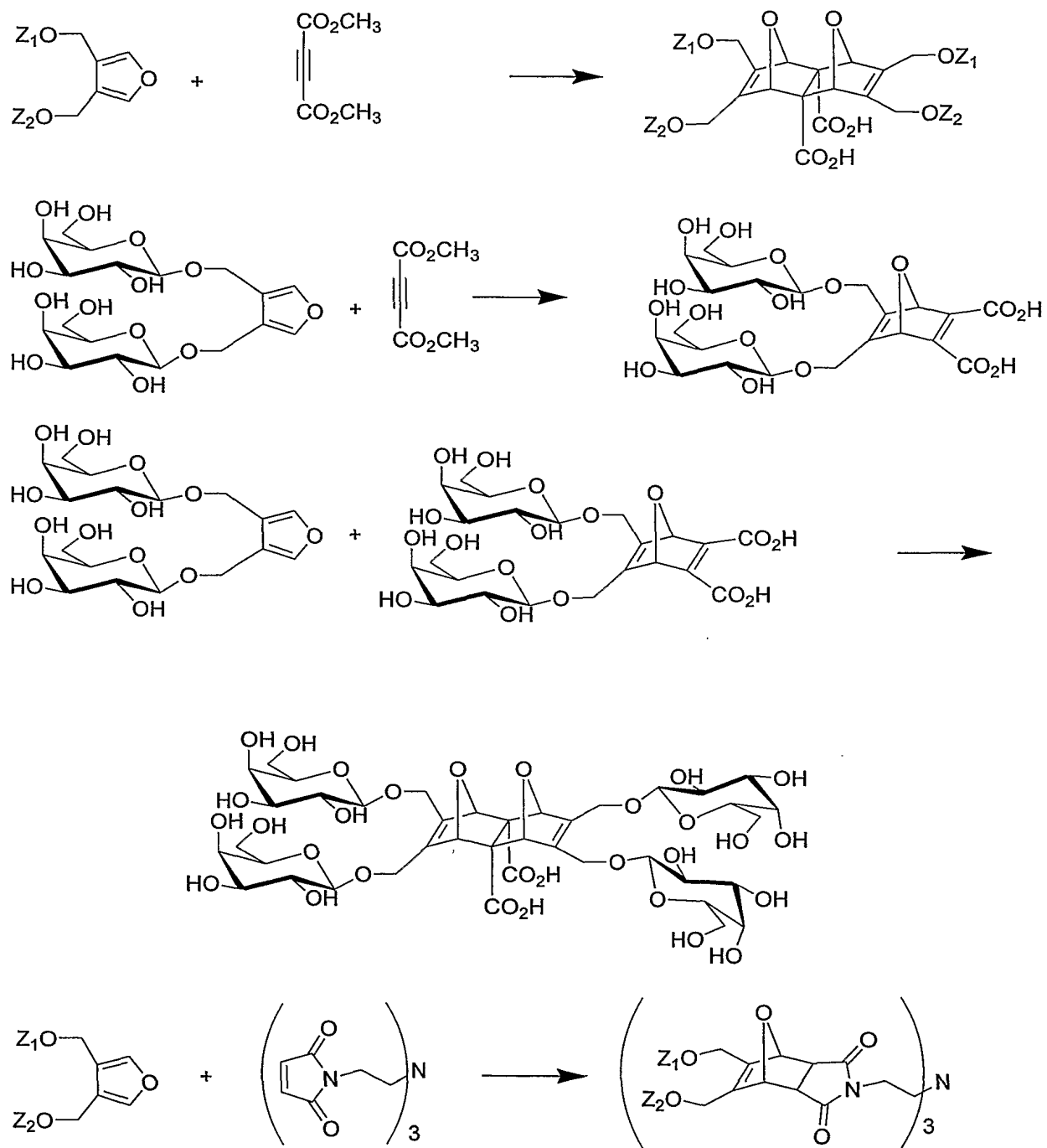
**Figur 2**

a)

 $Z_1$  = Saccharid 1, Wirkstoff, Nukleinsäure usw. $Z_2$  = Saccharid 2, Wirkstoff, Nukleinsäure usw. $Z_3$  = Saccharid 3, Wirkstoff, Nukleinsäure usw.

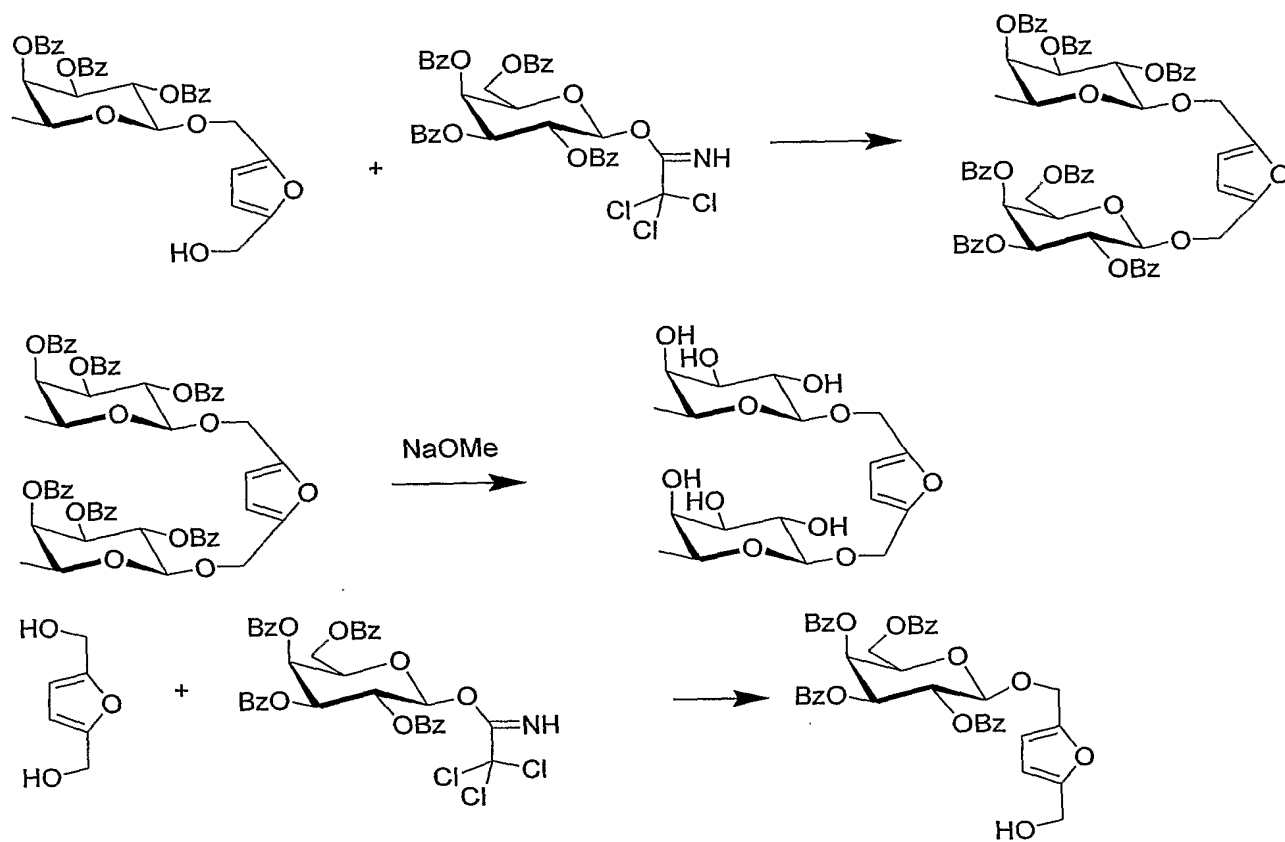
b)



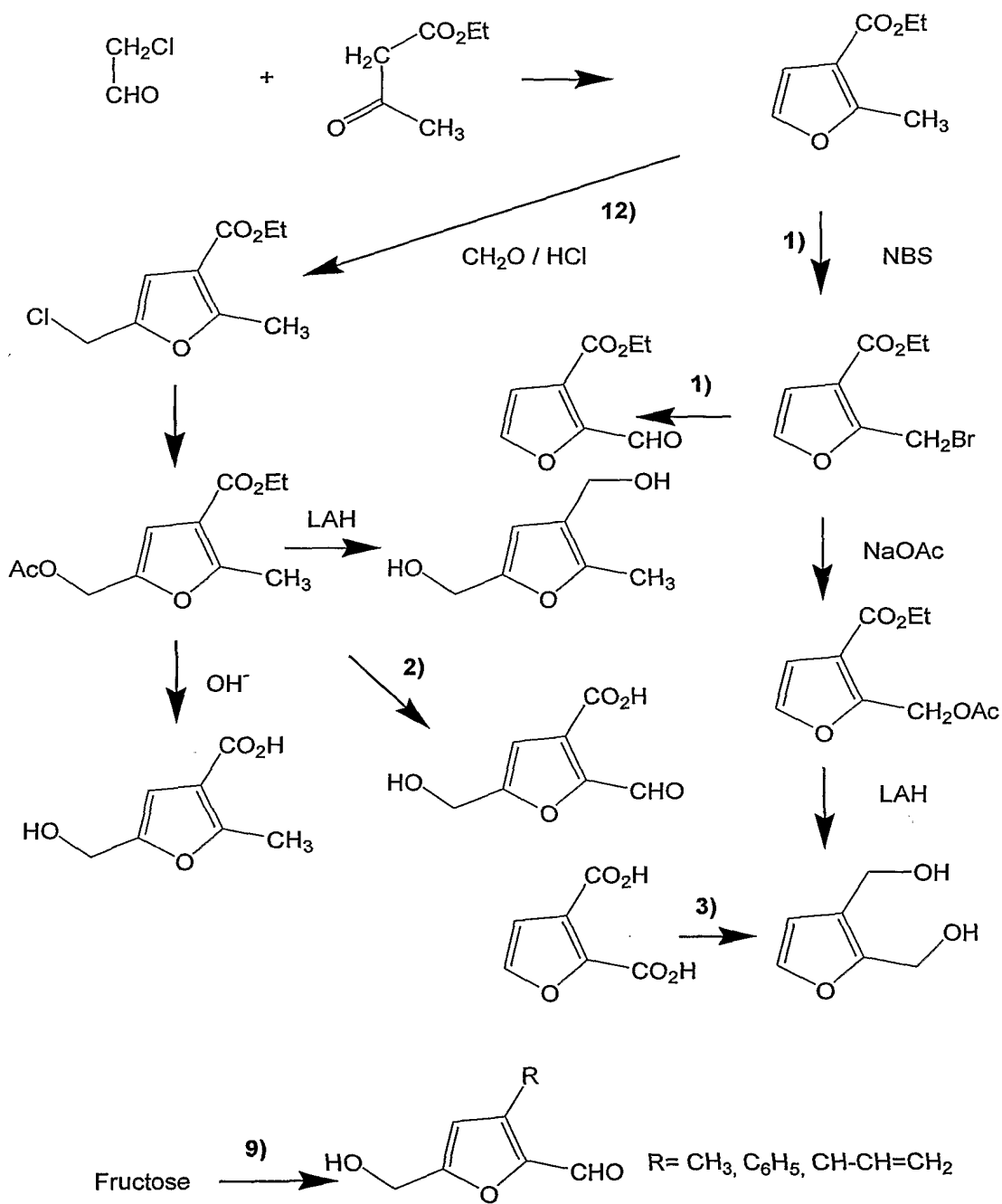
**Figur 3**

**Figur 4**

Weitere Bausteine für die DA-Reaktion

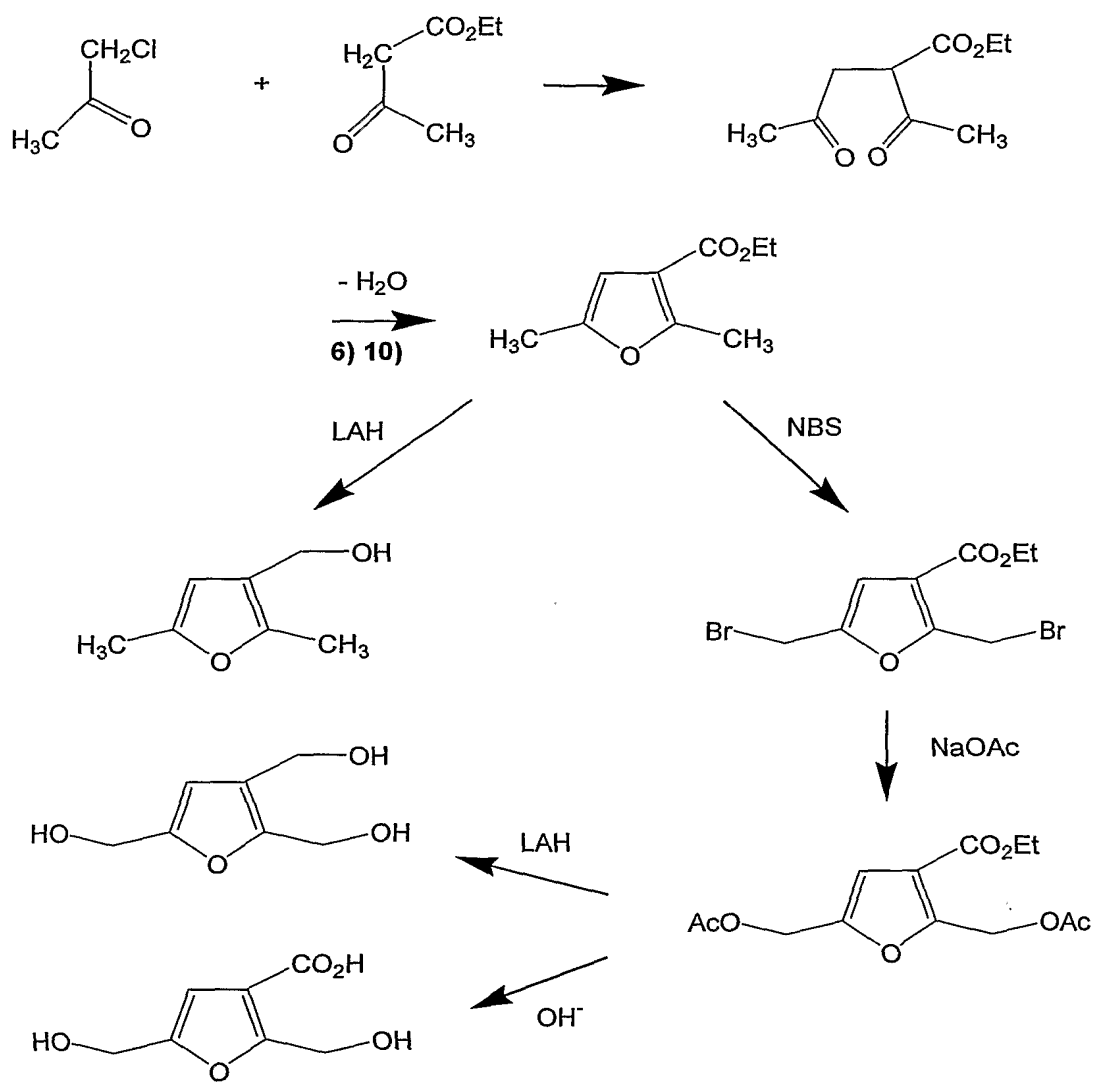


Figur 5a



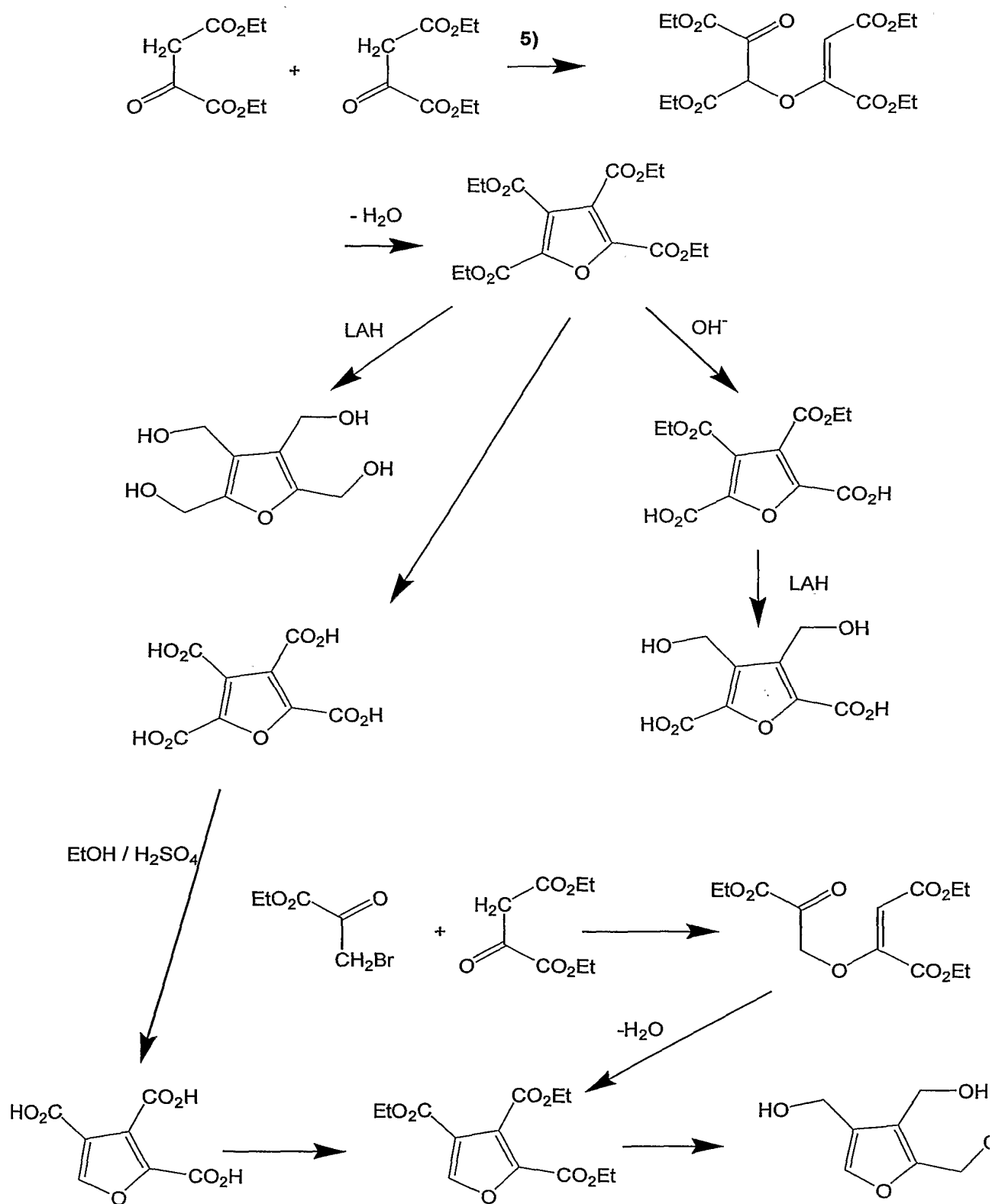
6/12

Figur 5b



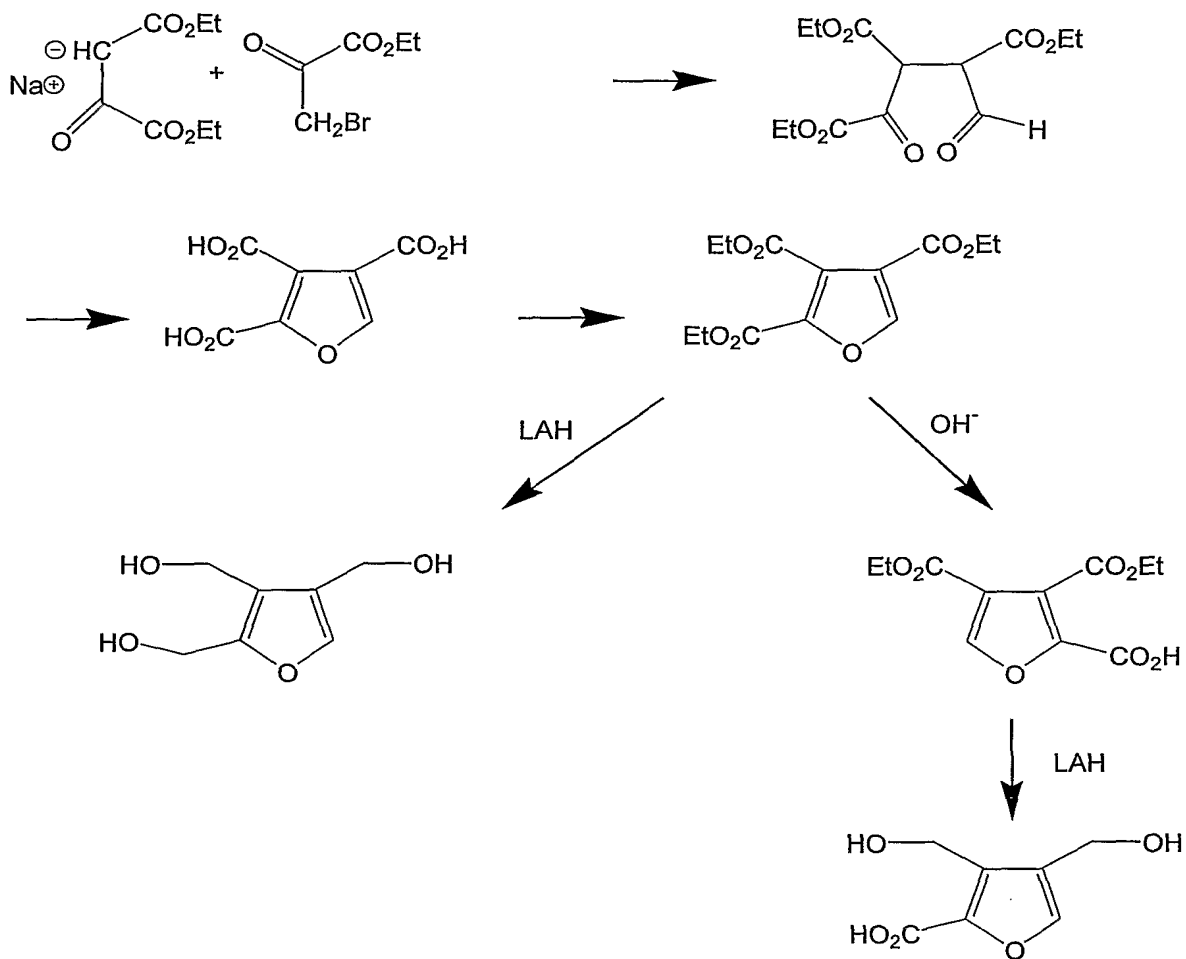
7/12

Figur 5c



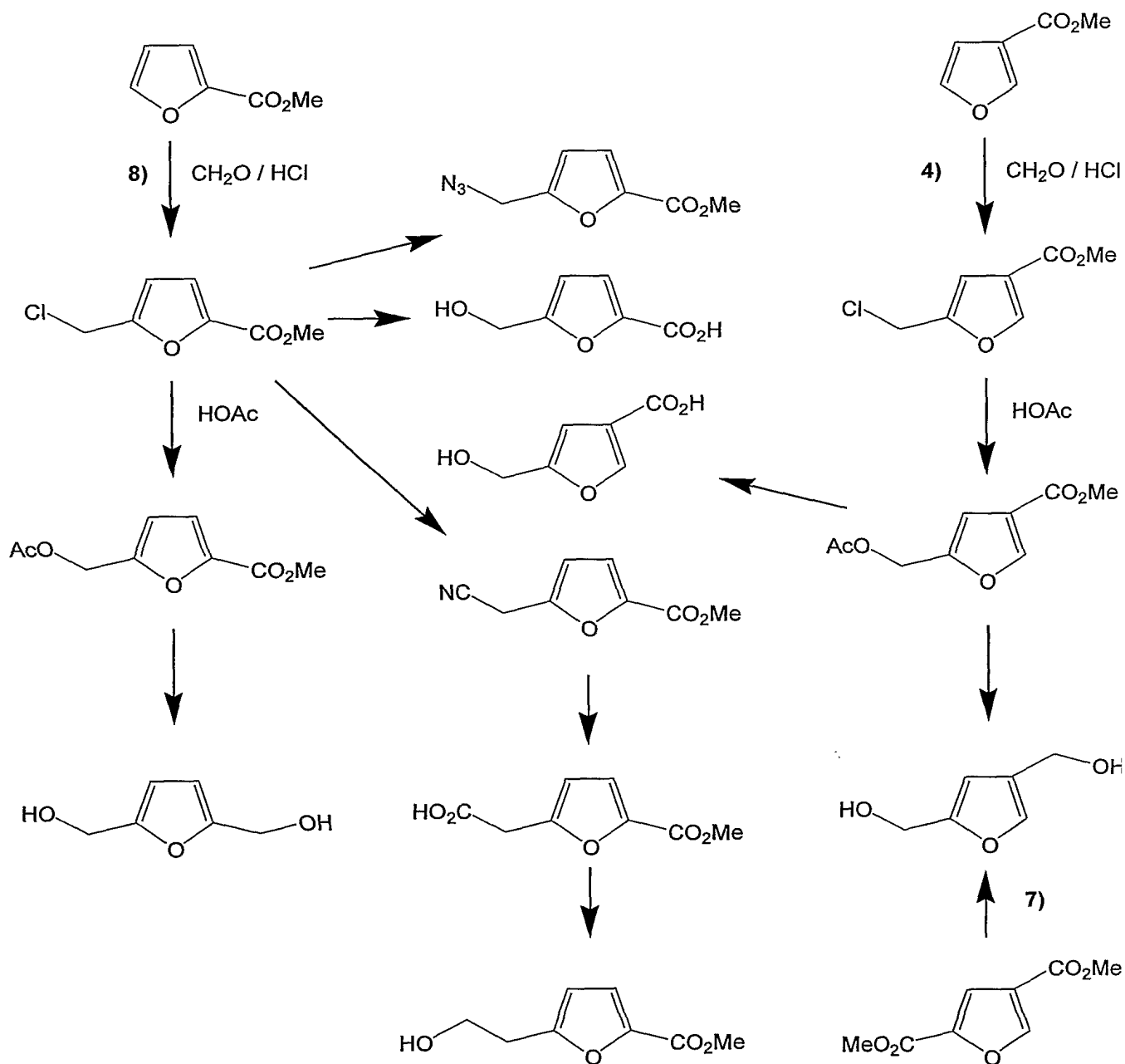
8/12

Figur 5d



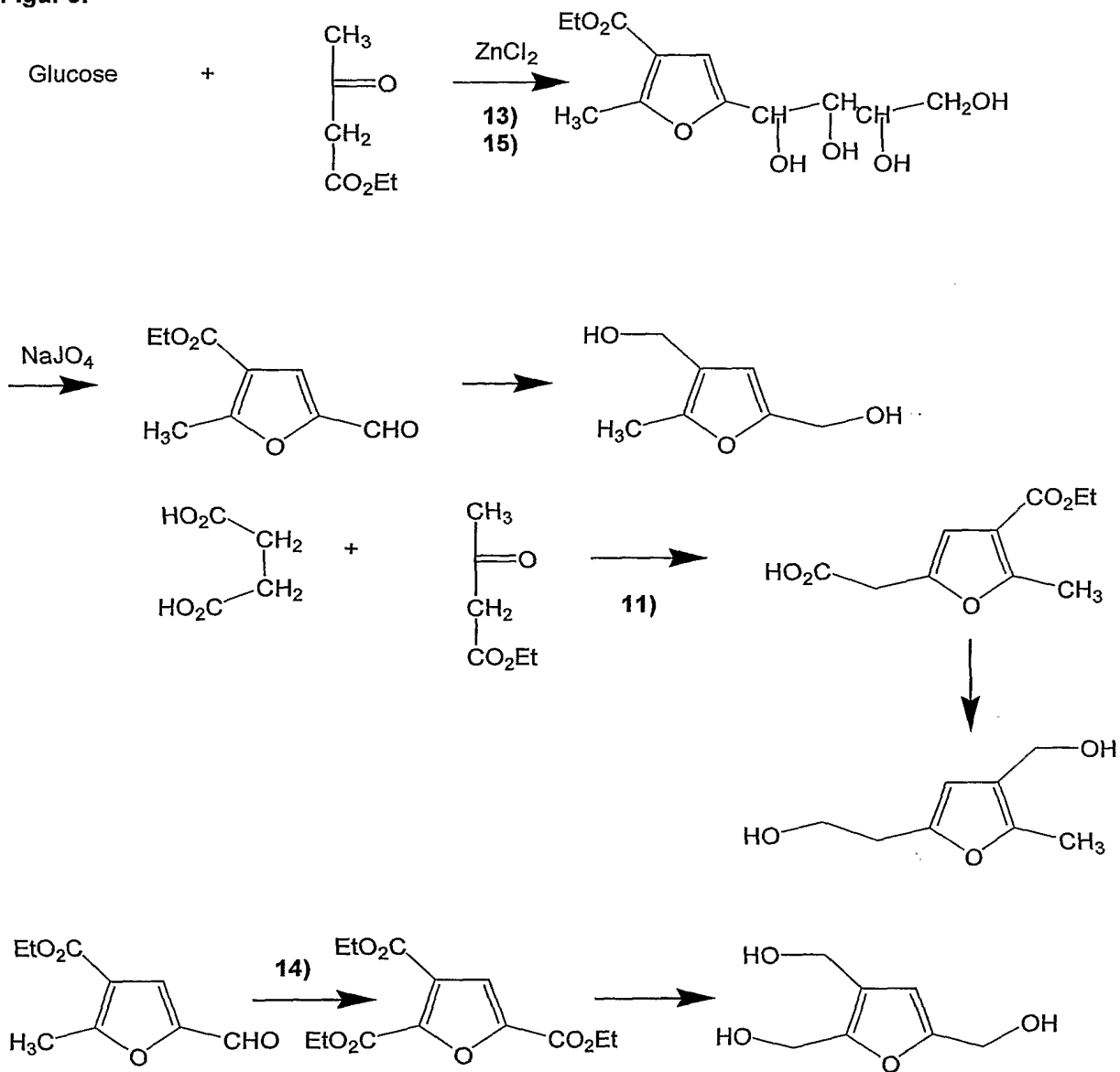


Figur 5e



10/12

Figur 5f

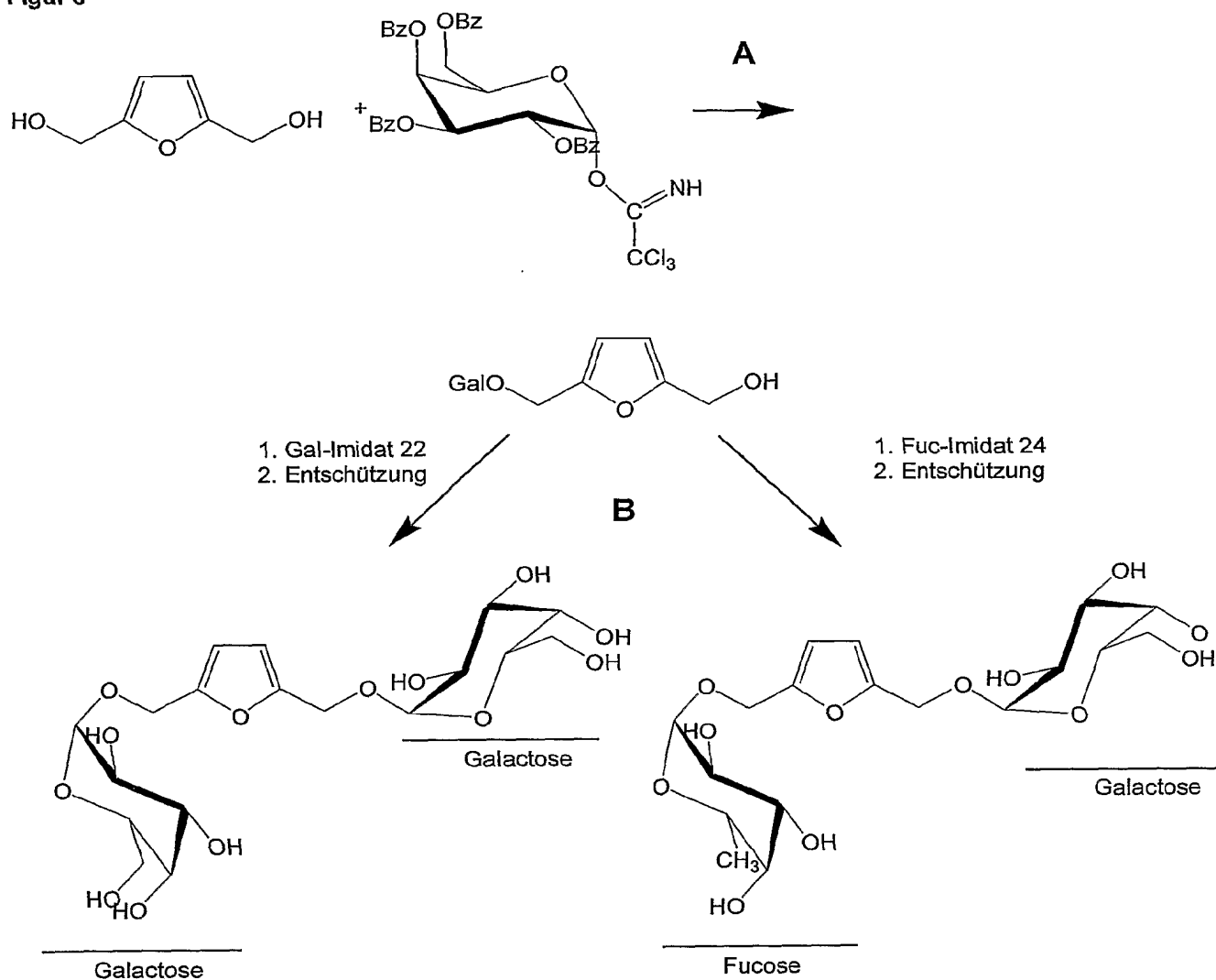


**Literatur Fig. 5(a) – 5(f)**

1. M.C. Zaluski, M. Robba, M. Bonhomme Bull. Soc. Chim. France 1970, 1445-1450 (auch Aldehyd → Nitril → Aldehyd);
2. A. Toro, P. deslongchamps synthetic Communications 29 (13), 2317-2321 (1999);
3. R.G. Jones, J. Am. Chem. Soc. 77, 4069 (1955);
4. M. Elliot, N.F. Janes, B.C. Pearson J. Chem. Soc. C 1971, 2552-2554;
5. T. Reichenstein, A. Grüssner, K. Schindler, E. Hardmeier Helv. Chim. Acta 16, 276-289 (1933);
6. R.A. Kretchmer, R.A. Latair J. Org. Chem. 43, 4596 (1978);
7. D.L. Dare, I.D. Entwistle, R.A.W. Johnstone J. Chem. Soc. Perkin I 1973, 1130-1134;
8. O. Moldenhauer J. Prakt. Chemie 330, 825 (1988);
9. C. Fayet, J. Gelas Carbohydr. Res. 155, 399-406 (1986);
10. O. Dann et al. Chem. Ber. 85, 457 (1952);
11. L.K. Dalton, Austr. J. Chem. 17, 1174-1181 (1964);
12. M. Valenta, P. Malon, M. Jandra, J. Srogl Collect. Czech Chem. Commun. 37, 493 (1972);
13. F. Garcia Gonzalez, Adv. Carbohydr. Chem. 11, 97-144 (1956);
14. T. Szeki, E. Laszlo Chem. Ber. 73, 924-929 (1940);
15. J.K.N. Jones, J. Chem. Soc., 116-119 (1945).

12/12

Figur 6



Gal = Galactose; Fuc = Fucose

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: Application No  
PCT/ NL 01/03237

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07H1/00 C07H15/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JAROSZ, SLAWOMIR ET AL: "Synthesis of sugar-derived 2'- and 3'-substituted furans and their application in Diels-Alder reactions" EUR. J. ORG. CHEM. (2001), (15), 2955-2964 , 2001, XP002186442 page W	1-9
X	HELLIWELL, MADELEINE ET AL: "Asymmetric synthesis of (5S)-4-deoxy-5-C-(4-nitrophenyl)-L-threo-pentose and (5R)-5-C-(4-nitrophenyl)-L-arabinose" TETRAHEDRON LETT. (1999), 40(49), 8651-8655 , 1999, XP004184866 the whole document	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 January 2002

Date of mailing of the international search report

16/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardili, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 01/03237

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PONTEN, FRITIOF ET AL: "Synthesis of Polycyclic Oxanorbornanes via a Sequential Epoxyhexopyranoside Ring Contraction-Intramolecular Diels -Alder Reaction" J. ORG. CHEM. (1997), 62(23), 7978-7983 , 1997, XP002186444 the whole document	1-9
X	TROTTER, N. S. ET AL: "A Diels -Alder strategy to 1,4-glycosidically linked monocarba -disaccharides" TETRAHEDRON LETT. (2000), 41(46), 8957-8962 , 2000, XP004236168 the whole document	1-9
X	LUBINEAU, ANDRE ET AL: "Preparation of.alpha.- and.beta.-dienyl glycosides used as dienes in aqueous Diels -Alder reactions. Influence of the carbohydrate moiety on the thermodynamics of the reaction" CARBOHYDR. RES. (1995), 270(2), 163-79 , 1995, XP004022030 the whole document	1-9
X	PELLEGRINET, S.C. ET AL.: "Diels-Alder reactions of D-glucose-derived dienophiles with cyclopentadiene: a computational study" TETRAHEDRON, vol. 56, 2000, pages 5311-6, XP004210195 the whole document	1-9
X	WO 90 12773 A (BEGHIN SAY SA) 1 November 1990 (1990-11-01) s. die Beispiele	1-9
X	EP 0 505 267 A (ELF AQUITAINE) 23 September 1992 (1992-09-23) the whole document	1-9
X	EP 0 287 353 A (ERBA CARLO SPA) 19 October 1988 (1988-10-19) the whole document	1-9
X	EP 0 587 471 A (BEGHIN SAY ERIDANIA) 16 March 1994 (1994-03-16) s. die Beispiele	1-9
X	WO 98 47910 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC ;MCGEE DANNY (US); SETTLE ALECIA (US);) 29 October 1998 (1998-10-29) s. insbesondere die Seiten 66, 78, 92	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In application No  
PCT/DE 01/03237

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9012773	A	01-11-1990	FR 2645855 A1	19-10-1990
			AT 116632 T	15-01-1995
			DE 69015763 D1	16-02-1995
			DE 69015763 T2	11-05-1995
			EP 0423300 A1	24-04-1991
			WO 9012773 A1	01-11-1990
			JP 3505743 T	12-12-1991
			US 5169943 A	08-12-1992
EP 0505267	A	23-09-1992	FR 2674248 A1	25-09-1992
			CA 2063306 A1	20-09-1992
			EP 0505267 A1	23-09-1992
			IE 920836 A1	23-09-1992
			JP 5117296 A	14-05-1993
			NO 921054 A	21-09-1992
			US 5262525 A	16-11-1993
EP 0287353	A	19-10-1988	EP 0287353 A2	19-10-1988
			JP 63290893 A	28-11-1988
			US 4973674 A	27-11-1990
EP 0587471	A	16-03-1994	FR 2695122 A1	04-03-1994
			EP 0587471 A1	16-03-1994
WO 9847910	A	29-10-1998	AU 7152098 A	13-11-1998
			EP 0979233 A1	16-02-2000
			JP 2001520660 T	30-10-2001
			WO 9847910 A1	29-10-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 01/03237

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07H1/00 C07H15/26

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	JAROSZ, SLAWOMIR ET AL: "Synthesis of sugar-derived 2'- and 3'-substituted furans and their application in Diels-Alder reactions" EUR. J. ORG. CHEM. (2001), (15), 2955-2964 , , 2001, XP002186442 Seite W	1-9
X	HELLIWELL, MADELEINE ET AL: "Asymmetric synthesis of (5S)-4-deoxy-5-C-(4-nitrophenyl)-L-threo-pentose and (5R)-5-C-(4-nitrophenyl)-L-arabinose" TETRAHEDRON LETT. (1999), 40(49), 8651-8655, , 1999, XP004184866 das ganze Dokument	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Januar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/01/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bardili, W



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen  
PCI/DE 01/03237

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PONTEN, FRITIOF ET AL: "Synthesis of Polycyclic Oxanorbornanes via a Sequential Epoxyhexopyranoside Ring Contraction-Intramolecular Diels -Alder Reaction" J. ORG. CHEM. (1997), 62(23), 7978-7983 , 1997, XP002186444 das ganze Dokument ---	1-9
X	TROTTER, N. S. ET AL: "A Diels -Alder strategy to 1,4-glycosidically linked monocarba -disaccharides" TETRAHEDRON LETT. (2000), 41(46), 8957-8962 , 2000, XP004236168 das ganze Dokument ---	1-9
X	LUBINEAU, ANDRE ET AL: "Preparation of.alpha.- and.beta.-dienyl glycosides used as dienes in aqueous Diels -Alder reactions. Influence of the carbohydrate moiety on the thermodynamics of the reaction" CARBOHYDR. RES. (1995), 270(2), 163-79 , 1995, XP004022030 das ganze Dokument ---	1-9
X	PELLEGRINET, S.C. ET AL.: "Diels-Alder reactions of D-glucose-derived dienophiles with cyclopentadiene: a computational study" TETRAHEDRON, Bd. 56, 2000, Seiten 5311-6, XP004210195 das ganze Dokument ---	1-9
X	WO 90 12773 A (BEGHIN SAY SA) 1. November 1990 (1990-11-01) s. die Beispiele ---	1-9
X	EP 0 505 267 A (ELF AQUITAINE) 23. September 1992 (1992-09-23) das ganze Dokument ---	1-9
X	EP 0 287 353 A (ERBA CARLO SPA) 19. Oktober 1988 (1988-10-19) das ganze Dokument ---	1-9
X	EP 0 587 471 A (BEGHIN SAY ERIDANIA) 16. März 1994 (1994-03-16) s. die Beispiele ---	1-9
X	WO 98 47910 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC ;MCGEE DANNY (US); SETTLE ALECIA (US);) 29. Oktober 1998 (1998-10-29) s. insbesondere die Seiten 66, 78, 92 -----	1-9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03237

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9012773 A	01-11-1990	FR 2645855 A1	19-10-1990
		AT 116632 T	15-01-1995
		DE 69015763 D1	16-02-1995
		DE 69015763 T2	11-05-1995
		EP 0423300 A1	24-04-1991
		WO 9012773 A1	01-11-1990
		JP 3505743 T	12-12-1991
		US 5169943 A	08-12-1992
EP 0505267 A	23-09-1992	FR 2674248 A1	25-09-1992
		CA 2063306 A1	20-09-1992
		EP 0505267 A1	23-09-1992
		IE 920836 A1	23-09-1992
		JP 5117296 A	14-05-1993
		NO 921054 A	21-09-1992
		US 5262525 A	16-11-1993
EP 0287353 A	19-10-1988	EP 0287353 A2	19-10-1988
		JP 63290893 A	28-11-1988
		US 4973674 A	27-11-1990
EP 0587471 A	16-03-1994	FR 2695122 A1	04-03-1994
		EP 0587471 A1	16-03-1994
WO 9847910 A	29-10-1998	AU 7152098 A	13-11-1998
		EP 0979233 A1	16-02-2000
		JP 2001520660 T	30-10-2001
		WO 9847910 A1	29-10-1998